

Université de Montréal

Étude de la pharmacologie de ligands  
du récepteur EP<sub>4</sub> de prostaglandine E<sub>2</sub>

par

Martin Leduc

Département de Biochimie,  
Centre de recherche, CHU Ste-Justine  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Biochimie

Novembre 2010

© Martin Leduc, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :  
Étude de la pharmacologie de ligands  
du récepteur EP<sub>4</sub> de prostaglandine E<sub>2</sub>

présentée par :  
Martin Leduc

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Audrey Claing, président-rapporteur  
Nikolaus Heveker, directeur de recherche  
Sylvain Chemtob, codirecteur  
Graciela Piñeyro, membre du jury  
Jean-Luc Parent, examinateur externe  
Roger Lippé, représentant du doyen

## Résumé

La prostaglandine  $E_2$  est une hormone lipidique produite abondamment dans le corps, incluant dans le rein où elle agit localement pour réguler les fonctions rénales. Un couplage à la protéine  $G\alpha_s$  menant à une production d'AMPc a classiquement été attribué au récepteur  $EP_4$  de  $PGE_2$ . La signalisation d' $EP_4$  s'est cependant avérée plus complexe et implique aussi un couplage aux protéines sensibles à la PTX  $G\alpha_i$  et des effets reliés aux  $\beta$ -arrestines. Il y a maintenant plusieurs exemples de l'activation sélective de voies de signalisation indépendantes par des ligands des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), et ce concept désigné sélectivité fonctionnelle pourrait être exploité dans le développement de nouveaux médicaments plus spécifiques et efficaces.

Dans une première étude, la puissance et l'activité intrinsèque d'une série de ligands d' $EP_4$  pour l'activation de  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$  et de la  $\beta$ -arrestine ont été systématiquement déterminées relativement au ligand endogène  $PGE_2$ . Dans ce but, trois essais de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) ont été adaptés pour évaluer les différentes voies dans des cellules vivantes. Nos résultats montrent une sélectivité fonctionnelle importante parmi les agonistes évalués et ont une implication pour l'utilisation d'analogues de la  $PGE_2$  dans un contexte expérimental et possiblement clinique, puisque leur spectre d'activité diffère de l'agoniste naturel. La méthodologie basée sur le BRET utilisée lors de cette première évaluation systématique d'une série d'agonistes d' $EP_4$  devrait être applicable à l'étude d'autres RCPG.

Dans une deuxième étude, des peptides reproduisant des régions juxtamembranaires extracellulaires du récepteur  $EP_4$  ont été conçus selon le raisonnement que des peptides ciblant des régions éloignées du site de liaison du ligand naturel ont le potentiel de ne moduler qu'une partie des activités du récepteur. L'insuffisance rénale aiguë est une complication médicale grave caractérisée par un déclin brusque et soutenu de la fonction rénale et pour laquelle il n'y a pas de traitement efficace à l'heure actuelle. Nos résultats montrent que le peptidomimétique

dérivé d'EP<sub>4</sub> optimisé (THG213.29) améliore significativement les fonctions rénales et les changements histologiques dans une insuffisance rénale aiguë induite par cisplatine ou par occlusion des artères rénales dans des rats Sprague-Dawley. Le THG213.29 ne compétitionnait pas la liaison de la PGE<sub>2</sub> à EP<sub>4</sub>, mais modulait la cinétique de dissociation de la PGE<sub>2</sub>, suggérant une liaison à un site allostérique d'EP<sub>4</sub>. Le THG213.29 démontrait une sélectivité fonctionnelle, puisqu'il inhibait partiellement la production d'AMPc induite par EP<sub>4</sub> mais n'affectait pas l'activation de Gα<sub>i</sub> ou le recrutement de la β-arrestine. Nos résultats indiquent que le THG213.29 représente une nouvelle classe d'agent diurétique possédant les propriétés d'un modulateur allostérique non-compétitif des fonctions du récepteur EP<sub>4</sub> pour l'amélioration des fonctions rénales suite à une insuffisance rénale aiguë.

**Mots clés :** PGE<sub>2</sub>, récepteur couplé aux protéines G, RCPG, sélectivité fonctionnelle, allostérie, insuffisance rénale aiguë, peptidomimétique, signalisation, transfert d'énergie de résonance de bioluminescence, BRET.

## Abstract

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is a lipid hormone mediator widely produced in the body, including in the kidney where it acts locally to regulate renal function. Classically, the PGE<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> has been classified as coupling to the Gα<sub>s</sub> subunit, leading to intracellular cAMP increases. However EP<sub>4</sub> signaling has been revealed to be more complex and also involves coupling to PTX-sensitive Gα<sub>i</sub> proteins and β-arrestin mediated effects. There are now many examples of selective activation of independent pathways by G-protein coupled receptor (GPCR) ligands, a concept referred to as functional selectivity that could be exploited for the development of more specific and efficacious drugs.

In a first study, the potencies and efficacies of a panel of EP<sub>4</sub> ligands were systematically determined for the activation of Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i</sub> and β-arrestin relative to the endogenous ligand PGE<sub>2</sub>. For this purpose, three bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays were adapted to evaluate the respective pathways in living cells. Our results suggest considerable functional selectivity among the tested, structurally related agonists and have implications for the use of PGE<sub>2</sub> analogues in experimental and possibly clinical settings, as their activity spectra on EP<sub>4</sub> differ from that of the native agonist. The BRET-based methodology used for this first systematic assessment of a set of EP<sub>4</sub> agonists should be applicable for the study of other GPCRs.

In a second study, peptides were derived from extracellular juxtamembranous regions of the EP<sub>4</sub> receptor following the rationale that peptides that target regions of the receptor remote of the ligand-binding site might modulate a subset of the EP<sub>4</sub>-mediated activities. Acute renal failure is a serious medical complication characterized by an abrupt and sustained decline in renal function and for which there is currently no effective treatment. Our results show that the optimized EP<sub>4</sub>-derived peptidomimetic THG213.29 significantly improved renal functions and histological changes in acute renal failure induced by either cisplatin or renal artery occlusion in Sprague-Dawley rats. THG213.29 did not displace PGE<sub>2</sub> binding to EP<sub>4</sub>, but

modulated PGE<sub>2</sub> binding dissociation kinetics, indicative of an allosteric binding mode. THG213.29 exhibited functional selectivity, as it partially inhibited EP<sub>4</sub>-mediated cAMP production but did not affect G $\alpha_i$  activation or  $\beta$ -arrestin recruitment. Our results demonstrate that THG213.29 represents a novel class of diuretic agent with noncompetitive allosteric modulator effects on EP<sub>4</sub> receptor function for improving renal function following acute renal failure.

**Keywords:** Prostaglandin, EP<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, G protein-coupled receptor, functional selectivity, allosteric, acute renal failure, peptidomimetic, signaling, BRET.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations .....	xi
Remerciements .....	xiii
INTRODUCTION.....	1
1. Les récepteurs couplés aux protéines G .....	3
1.1. Structure et organisation.....	3
1.2. Classification .....	6
1.3. Signalisation .....	7
1.3.1. Protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs .....	7
1.3.2. Autres partenaires de signalisation.....	11
1.3.3. Désensibilisation et internalisation .....	13
1.4. Interactions ligands-récepteurs.....	15
1.4.1. Efficacité des ligands .....	15
1.4.2. Activité constitutive et agonisme inverse .....	15
1.4.3. Sélectivité fonctionnelle et efficacité collatérale .....	18
1.4.4. Conformations multiples des RCPG .....	20
1.4.5. Modulateurs allostériques .....	21
1.4.5.1. Concepts de base et modèles théoriques .....	21
1.4.5.2. Avantages .....	23
1.4.5.3. Utilisation de peptides comme modulateurs allostériques .....	24
1.4.5.4. Peptide THG213.29.....	26
2. Le récepteur de prostaglandine E <sub>2</sub> de type EP <sub>4</sub> .....	28
2.1. Les prostaglandines .....	28
2.1.1. Structure et nomenclature .....	28
2.1.2. Biosynthèse et transport .....	29

2.2.	Famille des récepteurs de prostanoïdes .....	30
2.3.	Le récepteur EP <sub>4</sub> .....	34
2.3.1.	Importance physiologique et physiopathologique .....	34
2.3.2.	Liaison du ligand .....	39
2.3.3.	Signalisation .....	40
2.3.4.	Régulation .....	43
2.4.	Rôle potentiel dans l'insuffisance rénale aiguë .....	44
2.4.1.	Structure et fonction normale du néphron .....	44
2.4.2.	L'insuffisance rénale aiguë .....	48
2.4.3.	Localisation et rôle d'EP <sub>4</sub> dans le rein .....	51
OBJECTIFS DE LA THÈSE .....		52
RÉSULTATS .....		53
Article 1 .....		54
Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP <sub>4</sub> receptor ligands .....		54
Article 2 .....		94
Restoration of renal functions by a novel prostaglandin EP <sub>4</sub> receptor-derived peptide in a rat model of acute renal failure .....		94
DISCUSSION .....		126
CONCLUSION .....		148
RÉFÉRENCES .....		149



## Liste des tableaux

Tableau 1. Famille des protéines G hétérotrimériques et leurs principaux effecteurs. .9	
Tableau 2. Affinité de liaison de ligands à des récepteurs de prostaglandine recombinants. ....32	
Tableau 3. Propriétés pharmacologiques des récepteurs de prostanoïdes.....33	

## Liste des figures

Figure 1. Diversité des récepteurs couplés aux protéines G.....	2
Figure 2. Topologie et structure tridimensionnelle des RCPG. ....	5
Figure 3. Structure tridimensionnelle des protéines G hétérotrimériques.....	8
Figure 4. Le cycle des protéines G hétérotrimériques.....	11
Figure 5. Désensibilisation, internalisation et recyclage des RCPG. ....	14
Figure 6. Classification de l'efficacité des ligands pour les RCPG. ....	16
Figure 7. Modèles d'activation des RCPG.....	17
Figure 8. Représentation schématique de la sélectivité fonctionnelle.....	19
Figure 9. Modèles des effets fonctionnels des modulateurs allostériques. ....	23
Figure 10. Biosynthèse des prostanoïdes. ....	31
Figure 11. Représentation schématique du récepteur EP <sub>4</sub> humain.....	35
Figure 12. Modèle des voies de signalisation du récepteur EP <sub>4</sub> .....	41
Figure 13. Situation et structure des néphrons. ....	45
Figure 14. Schéma détaillé d'un corpuscule rénal. ....	46
Figure 15. Interactions entre EP <sub>4</sub> et G $\alpha_s\beta_1\gamma_2$ mesurées par BRET.....	135
Figure 16. Mode d'action proposé des modulateurs allostériques peptidiques dérivés de jonctions juxta-membranaires de RCPG.....	143

## Liste des sigles et abréviations

7TM	Sept domaines transmembranaires
AC	Adénylate cyclase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKI	Lésion aiguë du rein ( <i>acute kidney injury</i> )
AMPc	3,5-adénosine monophosphate cyclique
BRET	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
COX	Cyclooxygénase
CREB	Protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DP	Récepteur de prostaglandine D <sub>2</sub>
EGR	Protéine de réponse précoce au facteur de croissance
EGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'épiderme
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EP	Récepteur de prostaglandine E <sub>2</sub>
ERK	Kinase régulée par signal extracellulaire
FP	Récepteur de prostaglandine F <sub>2α</sub>
FRET	Transfert d'énergie de résonance de fluorescence
FSH	Hormone de stimulation folliculaire
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GEF	Facteur d'échange du guanine
GRK	Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
HEK	Cellules de rein embryonnaire humain
ILK	Kinase liée aux intégrines
IP	Récepteur de prostacycline
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IRA	Insuffisance rénale aiguë

JNK	Kinase N-terminale c-Jun
LH	Hormone lutéinisante
LPA	Acide lysophosphatidique
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
MRP4	Protéine de résistance aux drogues multiples 4
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PG	Prostaglandine
PGT	Transporteur de prostaglandine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PL	Phospholipase
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire $\kappa$ B
NO	Oxyde nitrique
PP2A	Protéine phosphatase 2A
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS	Régulateur de la signalisation des protéines G
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux
TM	Transmembranaire
TP	Récepteur du thromboxane
TSH	Thyréostimuline
TX	Thromboxane

## Remerciements

La traversée du doctorat et l'écriture de cette thèse n'auraient pas été possible sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier :

Mon directeur Nikolaus Heveker pour les nombreuses discussions, pour son optimisme et son enthousiasme dans les moments de découragement ainsi que pour son soutien financier (incluant les très appréciés congrès Gordon à Ventura et Keystone en Irlande!).

Mon co-directeur Sylvain Chemtob pour m'avoir convaincu de faire mon doctorat au départ, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance, pour ses conseils avisés, pour sa passion et pour son soutien financier.

Tous les membres des deux laboratoires pour l'entraide, les discussions scientifiques et non-scientifiques, les lunchs partagés et l'agréable compagnie.

Les membres de mon comité de thèse, de mon examen pré-doctoral et de mon jury de thèse.

Les organismes qui m'ont fourni de l'aide financière : la Fondation Ste-Justine, la Fondation des maladies du cœur du Canada, la Fondation J.A. DeSève et la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

Mes parents et ma famille pour leur soutien, leur intérêt et leurs encouragements depuis le début de mes études.

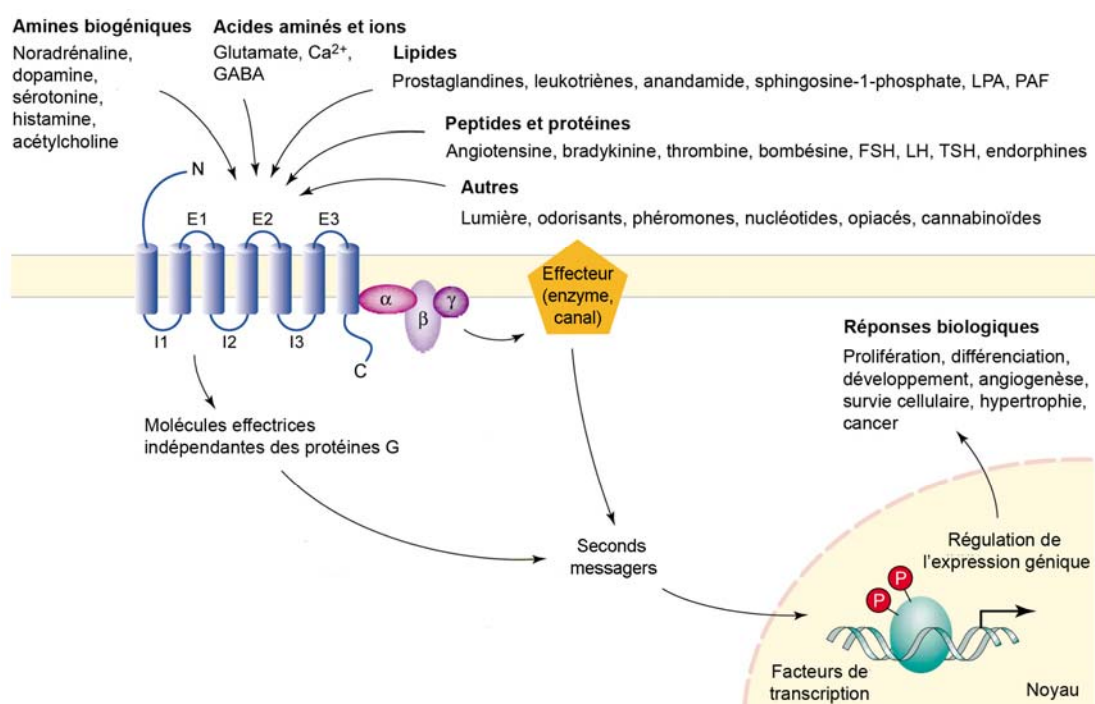
En terminant, un merci particulier à Marie-Claude pour m'avoir encouragé et avoir cru en moi pendant toutes ces années. Merci de faire partie de ma vie, ton soutien indéfectible a rendu ce parcours plus facile. Merci aussi à mes enfants Juliette et Nicolas qui m'apportent un grand bonheur et me permettent d'oublier tous mes tracas quand je rentre à la maison.

## INTRODUCTION

Les organismes vivants doivent constamment s'adapter à leur environnement changeant pour assurer leur survie. Cette adaptation se fait par des échanges d'information entre l'environnement extérieur et l'organisme. Au niveau cellulaire, cet échange d'information se fait via des stimuli qui sont captés à l'aide de récepteurs localisés à la surface des cellules. Lorsqu'un ligand (le stimulus) est reconnu par un récepteur, il y a transduction du signal par un réseau complexe d'interactions biochimiques à l'intérieur de la cellule, engendrant une réponse biologique. La plus grosse famille de récepteurs membranaires est la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui représentent 3 à 4% du génome humain (Foord, 2002). Les RCPG ont évolué pour permettre aux cellules de percevoir leur environnement par la reconnaissance sélective d'une très grande variété de stimuli tels que des photons, des odorants, des phérormones, des acides aminés, des ions, des nucléotides, des lipides et des polypeptides (Figure 1). Dû à la distribution ubiquitaire des RCPG et leur implication dans la quasi-totalité des processus physiologiques dans l'organisme, ces récepteurs représentent des cibles pharmacologiques importantes et on estime qu'environ 30% des médicaments sur le marché sont impliqués dans leur régulation (Overington et al., 2006). Dans ce contexte, l'étude des RCPG est importante pour bien comprendre le fonctionnement de ces récepteurs et l'effet des molécules qui les lient.

Selon le modèle classique de signalisation de RCPG, la liaison d'un agoniste induit l'activation de protéines G hétérotrimériques qui modulent ensuite des enzymes ou canaux ioniques effecteurs, ce qui peut générer la production de seconds messagers intracellulaires et permet la régulation de diverses fonctions biologiques (Figure 1). Au cours des récentes années, ce modèle s'est largement complexifié avec la découverte de nombreuses protéines capables d'interagir avec les RCPG pour participer à leur régulation et leur signalisation, parfois indépendamment des protéines G hétérotrimériques. La pharmacologie des RCPG s'est aussi complexifiée avec la découverte de molécules capables d'activer distinctivement certaines voies de

signalisation ou de lier le récepteur à des sites topographiquement distincts du ligand endogène. La présente thèse porte sur ces nouveaux aspects pharmacologiques de ligands de RCPG en utilisant le récepteur EP<sub>4</sub> de prostaglandine E<sub>2</sub> comme modèle.



**Figure 1. Diversité des récepteurs couplés aux protéines G.**

Une grande variété de ligands (incluant des amines biogéniques, acides aminés, ions, lipides, peptides et protéines) utilise les RCPG pour stimuler des cibles cytoplasmiques et nucléaires par des voies dépendantes et indépendantes des protéines G hétérotrimériques. Ces différentes voies de signalisation régulent des fonctions biologiques importantes. Adapté de Marinissen et Gutkind (2001).

# 1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Au début des années 70, l'existence physique de récepteurs à la surface des cellules demeurait controversée (Lefkowitz, 2004). Au cours de la décennie suivante, une première chaîne d'évènements moléculaires permettant la transmission d'un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule a été mise en évidence avec la découverte de l'adénylate cyclase et le second messenger AMPc (Sutherland, 1971), la protéine kinase dépendante de l'AMPc (Walsh et al., 1968) et la protéine régulatrice de l'adénylate cyclase liant les nucléotides guanyliques (protéine  $G_s$ ) (Ross and Gilman, 1977). Ce n'est qu'en 1979 que le premier récepteur couplé aux protéines G (RCPG), le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, a pu être purifié par chromatographie d'affinité (Caron et al., 1979). L'ADNc et le gène correspondant ont ensuite été clonés en 1986, révélant de façon imprévue que le récepteur partageait une homologie de séquence et une structure à sept domaines transmembranaires (7TM) avec le pigment visuel rhodopsine (Dixon et al., 1986). Plusieurs autres RCPG partageant cette structure à 7TM ont ensuite été clonés dans les années suivantes, et on estime aujourd'hui que le génome humain compte environ 750-800 cadres de lecture correspondant à des RCPG; de ce nombre il y aurait environ 342-367 RCPG à ligands non-olfactifs (Fredriksson et al., 2003; Vassilatis et al., 2003), incluant plus de 100 RCPG orphelins pour lesquels le ligand endogène n'a pas encore été identifié (Ahmed et al., 2009).

## 1.1. Structure et organisation

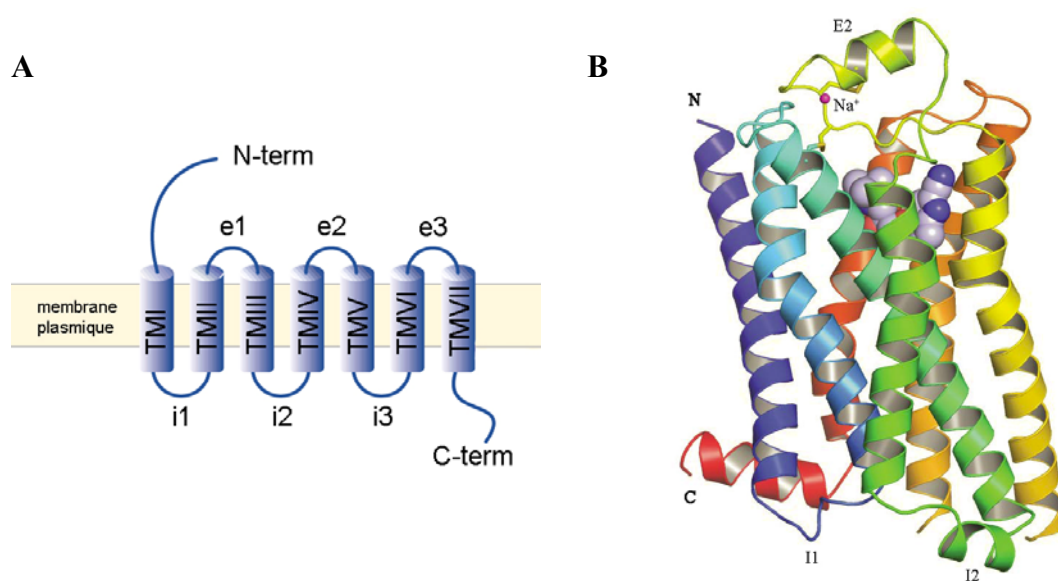
Les membres de la famille des RCPG partagent tous une topologie similaire comprenant un domaine aminé-terminal (N-term) extracellulaire, une queue carboxyl-terminale (C-term) intracellulaire ainsi que sept domaines transmembranaires (TMI-TMVII) reliés par trois boucles extracellulaires (e1-e3) et trois boucles intracellulaires (i1-i3) (Figure 2a). La première structure tridimensionnelle d'un RCPG a été obtenue suite à la cristallisation du pigment visuel rhodopsine



(Palczewski et al., 2000). Cette structure a permis de démontrer la présence de 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires et d'une courte huitième hélice  $\alpha$  parallèle au plan de la membrane plasmique du côté cytosolique. La rhodopsine diffère cependant des autres RCPG car son ligand, le 11-*cis*-rétinal, est lié de façon covalente à la protéine (opsine) où il agit comme agoniste inverse complet et maintient le récepteur dans une conformation inactive (Okada et al., 2001). L'absorption de la lumière induit l'isomérisation de *cis* à *trans* du ligand qui est alors converti en agoniste complet, menant à l'activation du récepteur.

La cristallisation des RCPG est rendue difficile par leur nature très flexible qui les rend instables lorsqu'extraits de membranes lipidiques avec des détergents, et c'est pourquoi il a fallu attendre plusieurs années avant d'obtenir des cristaux d'autres RCPG. Au cours des trois dernières années, des développements technologiques ont permis de déterminer la structure de trois nouveaux RCPG : les récepteurs  $\beta_2$ - (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007) et  $\beta_1$ -adrénergiques (Warne et al., 2008) et le récepteur  $A_{2A}$  d'adénosine (Jaakola et al., 2008). Ces structures ont pu être résolues suite à la stabilisation des récepteurs. Ainsi, la troisième boucle intracellulaire qui est une région très flexible a été stabilisée par la liaison d'un anticorps monoclonal (Rasmussen et al., 2007) ou en la remplaçant par l'insertion du lysozyme du bactériophage T4, une petite protéine cytosolique stable (Cherezov et al., 2007; Jaakola et al., 2008). Alternativement, le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique a été stabilisé par une délétion partielle de la boucle i3 et l'introduction d'un nombre limité de mutations ponctuelles qui ont augmenté la thermostabilité d'une certaine conformation du récepteur (Warne et al., 2008). Globalement, la structure de ces trois récepteurs s'est révélée être très semblable à celle de la rhodopsine. Certaines caractéristiques structurales distinguent cependant ces récepteurs, comme par exemple la présence d'une courte hélice  $\alpha$  dans la boucle e2 qui est absente dans la rhodopsine (Figure 2b). Une courte hélice  $\alpha$  additionnelle est aussi présente dans le domaine i2 du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique, et elle interagit directement avec le motif hautement conservé E/DRY qui est situé au bout de l'hélice 3 et est essentiel à l'activation du récepteur (Warne et al., 2008). L'interaction entre des résidus situés

aux extrémités des hélices 3 et 6 forment le « verrou ionique » dans la rhodopsine (et probablement dans les autres RCPG) et maintiendrait ainsi le récepteur dans une conformation inactive (Ballesteros et al., 2001). Cependant, contrairement à la rhodopsine, le verrou ionique des trois autres récepteurs cristallisés est rompu. L'absence du verrou ionique dans la structure cristalline de ces récepteurs pourrait être due au fait qu'ils ne sont pas dans une conformation complètement inactive. De nouvelles structures de RCPG liés à des agonistes inverses complets plutôt que partiels devraient permettre de déterminer si le verrou ionique est véritablement présent dans les récepteurs autres que la rhodopsine.



**Figure 2. Topologie et structure tridimensionnelle des RCPG.**

A) Représentation schématique de la topologie d'un RCPG avec ses différents domaines; B) Représentation en ruban de la structure tridimensionnelle du récepteur  $\beta_1$ -adrénérique. La coloration arc-en-ciel est utilisée du N-terminal (violet) au C-terminal (rouge), l'ion  $\text{Na}^+$  est en rose, les deux ponts disulfures adjacents sont en jaune et l'antagoniste cyanopindolol est représenté sous forme de modèle plein. Adapté de Warne et al. (2008).

Par ailleurs, bien qu'on ait très longtemps pensé que les RCPG n'existaient que sous forme monomérique, il est maintenant généralement accepté que plusieurs RCPG peuvent exister et fonctionner en tant qu'homodimères et hétérodimères et peuvent même former des oligomères d'ordre supérieur. La dimérisation des RCPG peut avoir un rôle important dans la maturation et le transport des récepteurs, leur interaction avec des partenaires de signalisation et leur internalisation (Terrillon and Bouvier, 2004).

## 1.2. Classification

Il existe plusieurs systèmes de classification de RCPG basés sur des propriétés physiologiques et structurales. Un des systèmes le plus utilisé pour les récepteurs de mammifères comprend les classes A, B, C, et F/S (Frizzled/Smoothed) (Vassilatis et al., 2003). Un système plus récent proposé par Fredricksson et al. (2003) a été établi pour l'ensemble des séquences de RCPG du génome humain suite à une analyse phylogénétique multiple. Ce système comporte cinq grandes familles formant l'acronyme GRAFS : glutamate, rhodopsine, adhésion, frizzled/taste2 et sécrétine.

- Famille de récepteurs glutamate (G) : cette famille correspond à la classe C de la classification A-B-C-F/S et comprend les récepteurs metabotropiques du glutamate (mGluR<sub>1-8</sub>), les récepteurs de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA<sub>B</sub>R1-2), le récepteur sensible au calcium (CaSR) et des récepteurs du goût (T1R). Ils possèdent un long domaine N-terminal responsable de la liaison au ligand.

- Famille de récepteurs rhodopsine (R) : il s'agit de la plus grande famille de récepteurs, correspondant à la classe A du système A-B-C-F/S. Elle compte environ 700 membres, dont plus de 200 récepteurs non-olfactifs. Elle est caractérisée par la présence des motifs NPxxY dans la TMVII et E/DRY à la jonction de la TMIII et de la boucle i2. Le N-terminal des récepteurs est généralement court et la plupart des ligands se lient dans la cavité formée entre les domaines transmembranaires. En plus de la rhodopsine, cette famille comprend entre autres les récepteurs de

prostaglandines, d'amines (dopamine, adrénérrique, muscarinique, sérotonine, etc.), de mélatonine, de chimiokines, d'opioïdes et d'hormones glycoprotéiques.

- Famille de récepteurs d'adhésion (A) : cette famille relativement nouvelle est constituée de récepteurs à 7TM fusionnés à de longs domaines N-terminaux contenant des motifs impliqués dans l'adhésion cellulaire.

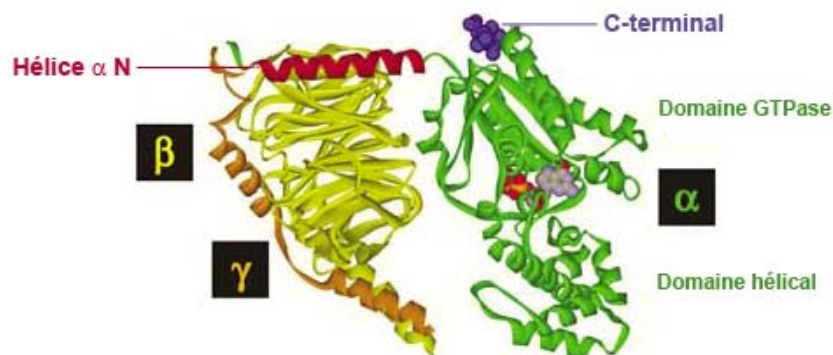
- Famille de récepteurs frizzled/taste2 (F) : cette famille comprend 10 récepteurs Frizzled (Fz) et le récepteur Smoothed (Smo) de la classe F/S, ainsi que certains récepteurs du goût (T2R). Les récepteurs Fz possèdent un long domaine N-terminal avec des cystéines conservées et sont impliqués dans le développement des métazoaires.

- Famille de récepteurs sécrétine (S) : cette famille correspond à la classe B de la classification A-B-C-F/S. Les récepteurs de cette famille possèdent un domaine N-terminal contenant des ponts cystéines conservés et impliqué dans la liaison de peptides de grande taille; ils agissent de façon paracrine. En plus du récepteur de la sécrétine, cette famille inclut entre autres les récepteurs de la calcitonine (CTR), du glucagon, de l'hormone parathyroïde (PTHr) et du peptide intestinal vasoactif (VIPR).

### 1.3. Signalisation

#### 1.3.1. Protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs

Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois sous-unités : une sous-unité  $\alpha$  possédant une activité GTPase et les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  qui sont étroitement associées et forment une unité fonctionnelle (Figure 3). Chez les mammifères, il existe 16 gènes codant pour des sous-unités  $\alpha$ , cinq pour les sous-unités  $\beta$  et 12 gènes de sous-unités  $\gamma$  (Milligan and Kostenis, 2006). Les protéines G hétérotrimériques peuvent être divisées en quatre familles selon le degré d'homologie de la séquence de la sous-unité  $\alpha$  :  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  et  $G_{12}$  (Tableau 1). La plupart des paires de sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (mais pas toutes) peuvent former des hétérodimères stables *in vitro*, suggérant qu'une grande variété de paires existe *in vivo* (Luttrell, 2006).



**Figure 3. Structure tridimensionnelle des protéines G hétérotrimériques.**

Structure de la forme inactive de l'hétérotrimère  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ . La sous-unité  $\alpha$  est colorée en vert, à l'exception de l'hélice  $\alpha$  N-terminale (rouge) et de la région C-terminale qui interagit avec les RCPG (mauve); la sous-unité  $\beta$  est jaune et la sous-unité  $\gamma$  est orange. La molécule de GDP est située entre les domaines GTPase et hélical de  $G\alpha$ . Adapté de Milligan et Kostenis (2006).

La structure cristallographique de la sous-unité  $\alpha$  montre la présence d'un domaine GTPase et d'un domaine hélical (Figure 3). Le domaine GTPase est responsable de l'hydrolyse du GTP et de la liaison avec le dimère  $\beta\gamma$ , le récepteur et les effecteurs tandis que le domaine hélical, composé de six hélices  $\alpha$ , forme un « couvercle » sur la poche de liaison du nucléotide. La sous-unité  $\beta$  possède une structure «  *$\beta$ -propeller* » composée de feuillets  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  qui forme une superhélice (« *coiled-coil* ») avec la portion N-terminale de la sous-unité  $\gamma$ . Les sous-unités  $\alpha$  (à l'exception de  $G_t$ ) sont modifiées post-traductionnellement dans la région N-terminale avec l'acide gras palmitate, et les membres de la famille  $G_i$  sont aussi myristoylés dans cette région. Ces modifications régulent la localisation membranaire et des interactions protéines-protéines. Les sous-unités  $\gamma$  sont quant à elles isoprénylées dans leur portion C-terminale par l'ajout post-traductionnel d'un groupe fonctionnel farnésyl ou géranylgéranyl, assurant l'association du dimère  $\beta\gamma$  à la membrane (Oldham and Hamm, 2008).

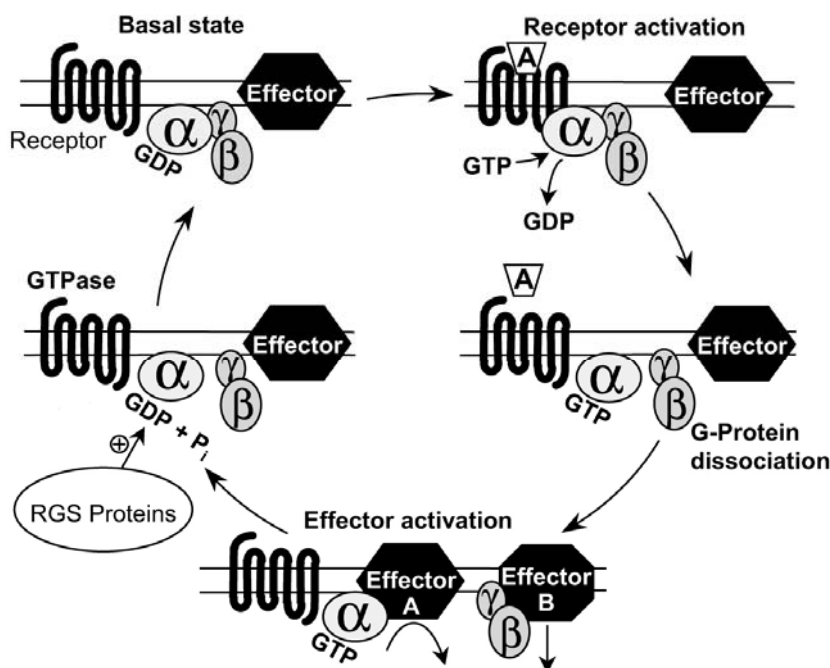
Famille	Sous-type	Principaux effecteurs
$G\alpha_s$	$G\alpha_s$	↑ adénylate cyclase (I à IX)
	$G\alpha_{sXL}$	↑ canaux maxi K
	$G\alpha_{olf}$	↑ tyrosines kinases Src
		↑ tubuline
$G\alpha_i$	$G\alpha_{i1-3}$	↓ adénylate cyclase (I, III, V, VI, VIII, IX)
	$G\alpha_o$	↑ ERK/MAPK
	$G\alpha_z$	↓ canaux $Ca^{2+}$
	$G\alpha_t$	↑ canaux $K^+$
	$G\alpha_{gust}$	↑ tubuline
		↑ tyrosines kinases Src
$G\alpha_q$	$G\alpha_q$	↑ phospholipase $C\beta$
	$G\alpha_{11}$	↑ RhoGEF
	$G\alpha_{14}$	↑ tyrosine kinase de Bruton
	$G\alpha_{15/16}$	↑ canaux $K^+$
$G\alpha_{12}$	$G\alpha_{12}$	↑ phospholipases $C\epsilon$ et D
	$G\alpha_{13}$	↑ iNOS
		↑ RhoGEF
		↑ protéines phosphatases 2A et 5
		↑ radixine
$G\beta\gamma$	$G\beta_{1-5}$	↑ phospholipase $C\beta$
	$G\gamma_{1-12}$	↓ adénylate cyclase (I)
		↑ adénylate cyclase (II, IV, VII)
		↑ PI-3 kinases
		↑ canaux $K^+$ (GIRK)
		↓ canaux $Ca^{2+}$
		↑ kinase c-Jun N-terminale (JNK)
		↑ tyrosines kinases Src et de Bruton
		↑ tubuline
		↑ protéine kinase D
		↑ RhoGEF

**Tableau 1. Famille des protéines G hétérotrimériques et leurs principaux effecteurs.**

Adapté de Milligan et Kostenis (2006).

Pour transmettre un signal spécifique et réversible du récepteur dans la cellule, les protéines G hétérotrimériques suivent un cycle d'activation/inactivation (Figure 4). À l'état basal, la sous-unité  $\alpha$  est liée au GDP et est associée aux sous-unités  $\beta\gamma$ . Selon le modèle classique, l'activation du récepteur par un agoniste entraîne un changement conformationnel qui augmente l'affinité du récepteur pour la protéine G. Le récepteur activé agit alors comme facteur d'échange de la guanine (GEF), ce qui mène au relâchement du GDP qui est remplacé par le GTP. La liaison du GTP amène un changement conformationnel dans la protéine G qui résulte en la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  et du dimère  $\beta\gamma$ , qui peuvent alors interagir avec et réguler différents effecteurs, tels que des canaux ioniques et des enzymes membranaires ou cytosoliques (Tableau 1). D'autres effecteurs peuvent ensuite être inhibés ou activés en aval par l'action de seconds messagers spécifiques comme l'AMPc, l'inositol 1,4,5-triphosphate et le  $\text{Ca}^{2+}$ . La sous-unité  $\alpha$ , qui possède une activité GTPase intrinsèque, hydrolyse ensuite le GTP en GDP, ce qui permet la réassociation de  $G\alpha$  avec  $G\beta\gamma$  et met fin à l'activation de la protéine G. L'activité GTPase de la sous-unité  $\alpha$  peut être accélérée par des régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) (Offermanns, 2003).

Le modèle classique de dissociation de  $G\alpha$  du complexe  $\beta\gamma$  demeure controversé et a été remis en question au cours des récentes années. En effet, plusieurs études suggèrent que le récepteur, les protéines G et certains effecteurs seraient précouplés et formeraient un complexe signalétique, et que des changements conformationnels plutôt que des associations/dissociations activeraient alors les différentes composantes de ce complexe (Nobles et al., 2005; Dupre et al., 2006; Galés et al., 2006; Quirk et al., 2007). D'autre part, le dogme classique proposait aussi qu'un récepteur donné n'interagisse qu'avec une seule famille de protéines G. Cependant, il est maintenant généralement accepté que le couplage fonctionnel d'un RCPG avec différentes familles de protéines G est possible, et ce phénomène a été observé pour plusieurs récepteurs (Hermans, 2003).



**Figure 4. Le cycle des protéines G hétérotrimériques.**

Le « A » représente un agoniste. Tiré de Offermanns (2003).

### 1.3.2. Autres partenaires de signalisation

Au-delà de leur couplage classique aux protéines G décrit dans la section précédente, les RCPG peuvent aussi lier plusieurs autres protéines membranaires et cytosoliques, et certaines de ces interactions mènent à une signalisation qui peut être indépendante des protéines G. Parmi ces protéines, les arrestines sont les mieux caractérisées.

Les arrestines forment une famille composée de quatre membres. L'expression des arrestines 1 et 4 est limitée aux bâtonnets et aux cônes de la rétine, respectivement, alors que les arrestines 2 et 3 (mieux connues sous le nom de  $\beta$ -arrestines 1 et 2) sont exprimées de façon ubiquitaire et interagissent avec la plupart des RCPG (Reiter and Lefkowitz, 2006). Les  $\beta$ -arrestines ont initialement été caractérisées pour leur rôle dans la désensibilisation puis l'internalisation des RCPG (voir section suivante), mais depuis une dizaine d'années plusieurs études ont



démontré leur fonction en tant que protéines d'échafaudage de complexes signalétiques (DeWire et al., 2007). Les échafaudages moléculaires sont des complexes multiprotéiques permettant de rassembler des membres spécifiques d'un réseau de signalisation pour leur donner un accès mutuel préférentiel, ce qui assure l'intégrité et la spécificité d'une réponse signalétique. Ce nouveau paradigme a été mis en évidence pour la première fois lorsque l'interaction entre la  $\beta$ -arrestine 1 et la tyrosine kinase cytoplasmique c-Src a été démontré, ce qui mène au recrutement de c-Src au récepteur activé puis à l'activation de ERK1/2 (Luttrell et al., 1999; DeFea et al., 2000). D'autres tyrosines kinases cytoplasmiques de la famille c-Src telles que Hck, Fgr et Yes sont aussi recrutées à des RCPG via leur interaction avec la  $\beta$ -arrestine (Reiter and Lefkowitz, 2006). Les  $\beta$ -arrestines peuvent aussi servir d'échafaudage aux modules de signalisation des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), une famille de kinases sérine/thréonine composée de p38, des kinases régulées par signal extracellulaire (ERK) 1/2, et de la kinase N-terminale c-Jun (JNK). Chaque MAPK peut être phosphorylée par une MAPK kinase, qui à son tour peut être phosphorylée par une MAPK kinase kinase, formant un module de signalisation qui est rassemblé dans un complexe signalétique spécifique par la  $\beta$ -arrestine (DeWire et al., 2007). D'autres voies de signalisation dépendantes des  $\beta$ -arrestines ont aussi été découvertes au cours des dernières années, comme par exemple la formation d'un module signalétique entre la  $\beta$ -arrestine 2, la kinase Akt et son régulateur négatif, la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Beaulieu et al., 2005). Les  $\beta$ -arrestines interagissent aussi avec l'inhibiteur I $\kappa$ B du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), menant à la stabilisation d'I $\kappa$ B et donc à l'inhibition de NF- $\kappa$ B (Witherow et al., 2004). Finalement, l'activation du récepteur de type 1 d'angiotensine II permet l'activation synergétique de la petite GTPase RhoA par la  $\beta$ -arrestine 1 et par la protéine G<sub>q/11</sub> (Barnes et al., 2005).

En plus des  $\beta$ -arrestines, plusieurs autres protéines peuvent interagir avec des RCPG spécifiques. Ces protéines, regroupées sous l'appellation « GIP » (*GPCR interacting proteins*, soit protéines interagissant avec les RCPG), peuvent être impliquées dans la modulation de la signalisation ou de la liaison des ligands mais

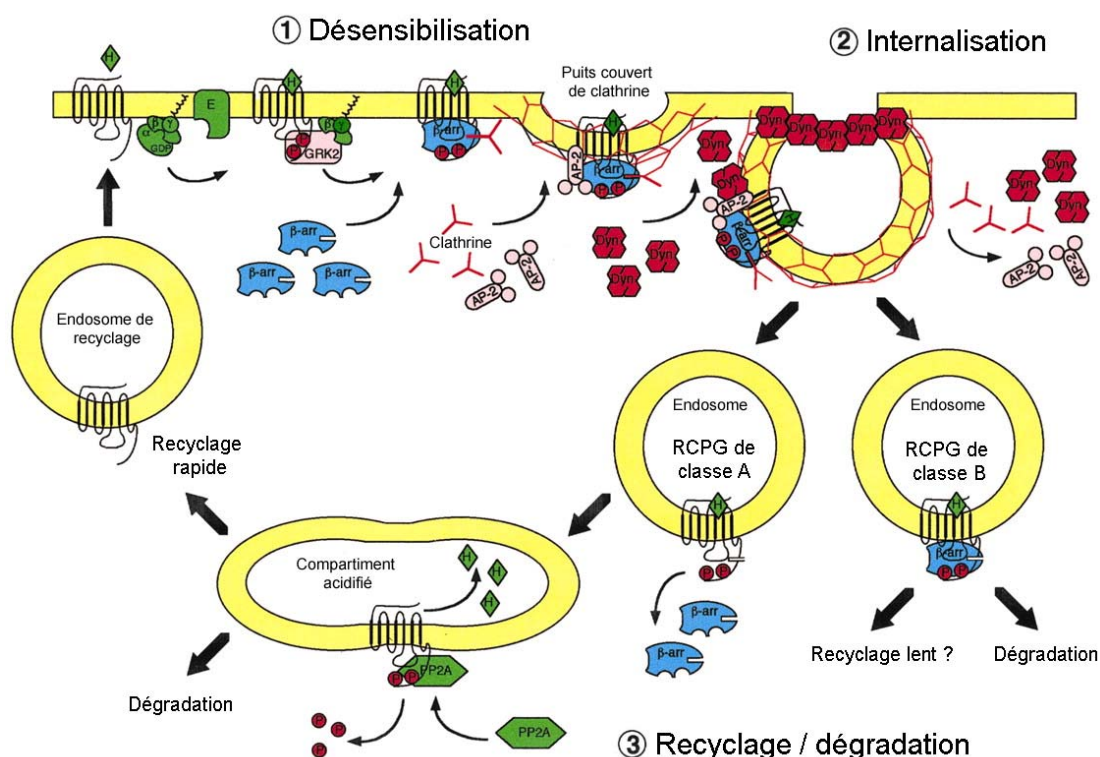
aussi dans la localisation ou le trafic des RCPG (Ritter and Hall, 2009). Les GIP peuvent être des protéines membranaires telles que d'autres RCPG (homo- ou hétéro-oligomérisation), des canaux ioniques, des récepteurs ionotropiques, et des récepteurs à domaine transmembranaire unique comme les protéines modifiant l'activité des récepteurs (RAMP). D'autres GIP sont des protéines solubles interagissant principalement avec le domaine carboxyl-terminal ou avec la troisième boucle intracellulaire des RCPG, dont plusieurs protéines contenant des domaines PDZ (Bockaert et al., 2004).

### **1.3.3. Désensibilisation et internalisation**

Suite à leur stimulation par un agoniste, la grande majorité des RCPG sont rapidement phosphorylés sur des résidus sérine et thréonine de la troisième boucle intracellulaire et/ou de la queue C-terminale par des kinases de RCPG (GRK), une famille de 7 kinases (GRK1-7) ayant différents profils d'expression tissulaire (Reiter and Lefkowitz, 2006). Des kinases régulées par des seconds messagers, telles que les protéines kinases A ou C, peuvent aussi phosphoryler les RCPG, menant à une désensibilisation dite « hétérologue », puisque des récepteurs non activés peuvent alors être phosphorylés suite à l'activation d'autres récepteurs distincts (Claing et al., 2002). La phosphorylation des RCPG par les GRKs augmente l'affinité de la  $\beta$ -arrestine pour le récepteur activé et le recrutement de la  $\beta$ -arrestine inhibe de façon stérique le couplage aux protéines G hétérotrimériques.

Le recrutement de la  $\beta$ -arrestine au récepteur activé entraîne ensuite leur internalisation dans des puits couverts de clathrine. La  $\beta$ -arrestine sert alors d'adaptateur entre le récepteur et différentes protéines associées au processus d'endocytose, dont la clathrine et l'adaptateur de clathrine AP2. Une fois internalisés dans les endosomes, les RCPG peuvent être déphosphorylés, resensibilisés et recyclés à la surface, être dirigés vers le lysosome puis dégradés, ou encore activer des voies de signalisation intracellulaires. On distingue deux classes de récepteurs selon la force de leur interaction avec la  $\beta$ -arrestine (Oakley et al., 1999; Oakley et al., 2000). Les récepteurs de classe « A » (par exemple le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique) recrutent la

$\beta$ -arrestine 2 de façon transitoire, se dissociant de cette dernière dans les puits couverts de clathrine. Ils internalisent sans l'arrestine et sont généralement recyclés rapidement. Les récepteurs de classe « B » (par exemple le récepteur de vasopressine 2) possèdent quant à eux une grappe conservée de résidus sérine et thréonine dans leur queue C-terminale permettant une association de plus grande affinité avec les  $\beta$ -arrestines 1 et 2. Ils internalisent avec l'arrestine, formant des complexes stables dans les endosomes. Ces récepteurs sont ensuite dégradés dans les lysosomes ou encore recyclés lentement (Figure 5). Finalement, il est à noter que bien que l'endocytose dépendante de la  $\beta$ -arrestine et de la clathrine soit utilisée par la majorité des RCPG, ces derniers peuvent aussi internaliser par des voies alternatives, soit via les cavéoles ou les vésicules « non couvertes » (Reiter and Lefkowitz, 2006).



**Figure 5. Désensibilisation, internalisation et recyclage des RCPG.**

Adapté de Luttrell et Lefkowitz (2002).

## 1.4. Interactions ligands-récepteurs

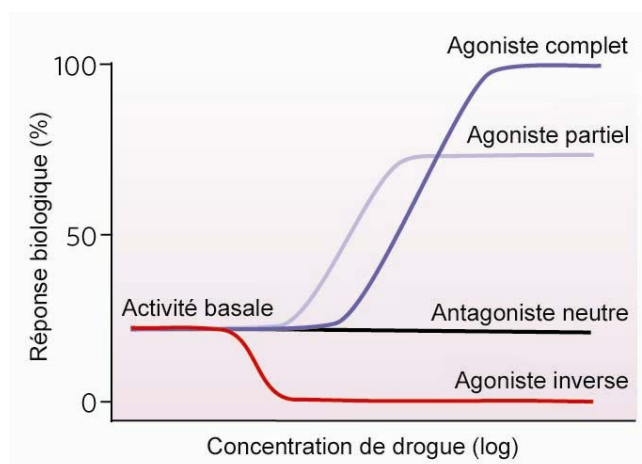
### 1.4.1. Efficacité des ligands

À partir du moment où il a été observé que des composés chimiques pouvaient induire différentes réponses pharmacologiques, les pharmacologues ont tenté de les classer. Le terme « activité intrinsèque » a initialement été introduit pour caractériser l'effet maximal ( $E_{\max}$ ) d'un ligand par rapport à un agoniste de référence dans un système expérimental donné (Ariens, 1954). L'activité intrinsèque permet donc de distinguer les agonistes complets qui produisent une réponse maximale, les agonistes partiels qui produisent une réponse sous-maximale et les antagonistes qui bloquent la réponse des agonistes. Stephenson (1956) a ensuite défini les deux propriétés importantes permettant de caractériser un agoniste : l'affinité, qui est la force de l'interaction entre le ligand et son récepteur, et l'efficacité, qui est la capacité du ligand de produire une réponse une fois lié. Le modèle de la pharmacologie des RCPG est basé à cette époque sur le concept que ces récepteurs agissent comme des interrupteurs « marche/arrêt » et une molécule possède alors de l'efficacité ou non pour induire une réponse physiologique.

### 1.4.2. Activité constitutive et agonisme inverse

La découverte par Costa et Herz (1989) que les RCPG peuvent spontanément produire une réponse physiologique (activité constitutive) et que certains ligands peuvent bloquer cette activité a forcé les pharmacologues à réviser la notion d'efficacité et les modèles d'activation des RCPG. Dans cette étude, l'activité basale élevée du récepteur delta opioïde exprimé dans des cellules de neuroblastome-gliome NG108-15 a été réduite en fonction de la concentration de l'antagoniste ICI174864, et cette réduction a été bloquée de façon compétitive par un autre antagoniste du récepteur opioïde (MR2266). Ces résultats démontraient donc que l'efficacité pouvait être positive ou négative. Comme la diminution de l'activité constitutive par des antagonistes est un événement actif, on a qualifié ces composés d'agonistes inverses,

tandis que les antagonistes pouvant seulement bloquer les effets induits par un agoniste ont été désignés antagonistes neutres (Figure 6). Bien qu'accueillie avec scepticisme au départ, la notion d'agonisme inverse a été élargie à plusieurs RCPG par la suite. Une revue de l'activité de 380 antagonistes de 73 différents RCPG dans des systèmes où une activité constitutive était présente a démontré que 85% étaient en réalité des agonistes inverse (Kenakin, 2004). De plus, l'importance physiologique de l'activité constitutive a été mise en évidence par la découverte pour certains récepteurs de mutations causant une hausse de leur activité constitutive et associées à diverse pathologies incluant l'hyperthyroïdisme, la rétinite pigmentaire et certaines maladies auto-immunes (Kenakin, 2005b).

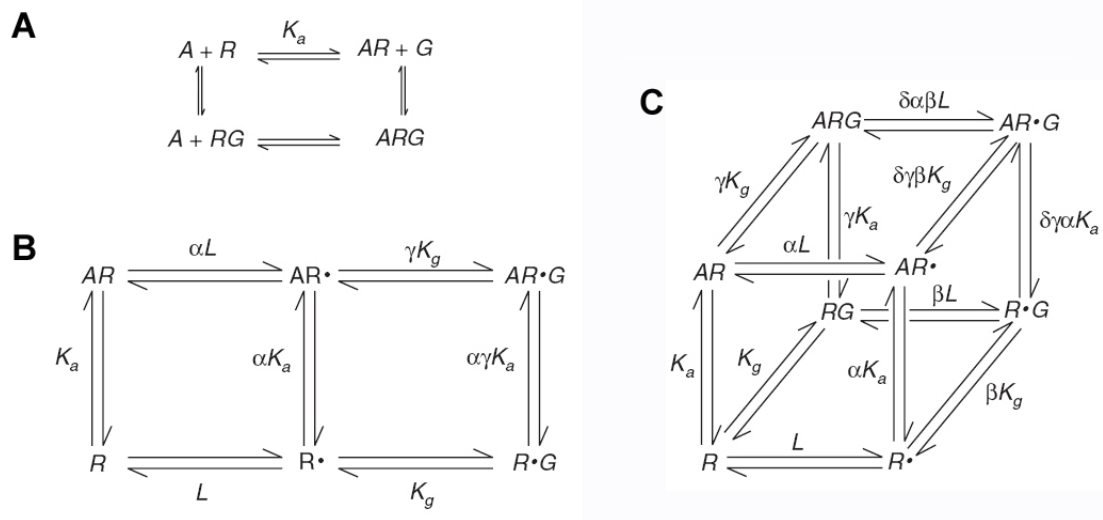


**Figure 6. Classification de l'efficacité des ligands pour les RCPG.**

Adapté de Rosenbaum et al. (2009).

L'observation d'activité constitutive était incompatible avec le modèle d'activation des RCPG le plus répandu à cette époque, soit le modèle complexe ternaire (De Lean et al., 1980). Dans ce modèle basé sur la loi d'action de masse, l'agoniste (A) lie le récepteur (R), et le complexe AR lie la protéine G (G) pour former un complexe ternaire actif ARG (Figure 7a). Afin d'accommoder le phénomène d'activité constitutive, le modèle complexe ternaire étendu a été proposé

(Samama et al., 1993). Dans ce modèle, des récepteurs sous forme active ( $R$ ) ou inactive ( $R^*$ ) coexistent et la tendance du système à produire de l'activité constitutive est définie par la constante allostérique  $L$  ( $L = [R^*] / [R]$ ). Le ligand possède de l'affinité pour le récepteur selon la constante d'association à l'équilibre  $K_a$ , et une affinité pour le récepteur activé de  $\alpha K_a$ . De façon similaire, le récepteur inactif possède une affinité pour la protéine  $G$  de  $K_g$ , et la présence du ligand change cette affinité en  $\gamma K_g$  (Figure 7b). Les constantes  $\alpha$  et  $\gamma$  sont propres au ligand et sont corrélées à l'efficacité. Finalement, le modèle complexe ternaire cubique a aussi été introduit par la suite pour inclure l'association thermodynamiquement nécessaire, bien que physiologiquement rare, entre le récepteur inactif et la protéine  $G$  (Weiss et al., 1996) (Figure 7c).



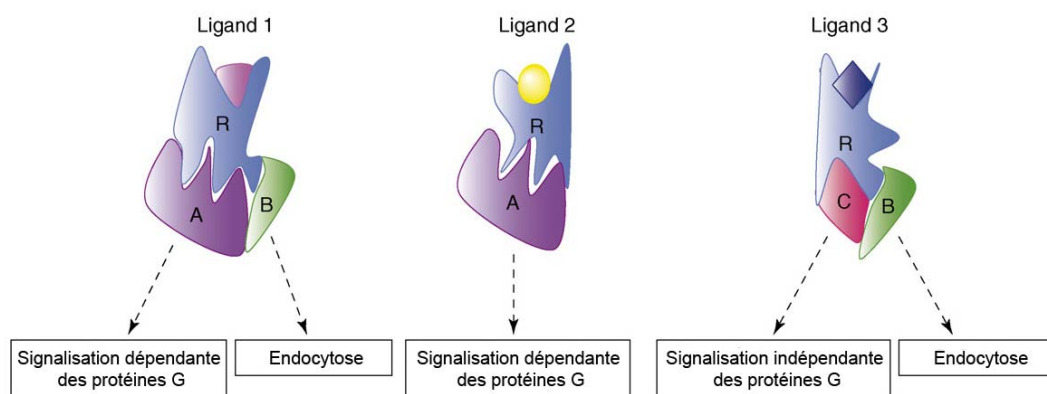
**Figure 7. Modèles d'activation des RCPG.**

A) modèle complexe ternaire; B) modèle complexe ternaire étendu; C) modèle complexe ternaire cubique.  $R$  : récepteur inactif;  $R^*$  : récepteur actif;  $A$  : ligand;  $G$  : protéines  $G$  hétérotrimériques;  $K_a$ ,  $K_g$  : constantes d'association à l'équilibre;  $L$  : constante allostérique;  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  : facteurs de coopérativité liées au ligand décrivant le changement d'affinité du récepteur pour la protéine  $G$  induit par le ligand. Adapté de Limbird (2004).

### 1.4.3. Sélectivité fonctionnelle et efficacité collatérale

Classiquement, l'efficacité des ligands était mesurée en utilisant une seule voie de signalisation, la plupart du temps celle associée à la protéine G à laquelle le récepteur se couplait. Cependant, tel que mentionné dans les sections précédentes (1.3.1 et 1.3.2), certains RCPG peuvent simultanément activer différents sous-types de protéines G et peuvent aussi interagir, parfois indépendamment des protéines G, avec divers partenaires intracellulaires ou membranaires. Les RCPG sont donc impliqués dans une grande variété d'activités pharmacologiques, incluant la modulation de différentes voies de signalisation, la phosphorylation du récepteur, la désensibilisation, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et l'internalisation du récepteur. Selon le modèle classique d'activation des RCPG, il existe un équilibre entre les états inactif (R) et actif ( $R^*$ ) du récepteur, ce qui implique que l'efficacité est une propriété intrinsèque à une paire ligand-récepteur, c'est-à-dire que pour un ligand particulier elle est semblable pour l'ensemble des voies de signalisation du récepteur. Or, la multiplication au cours des 10 à 15 dernières années des « points de vue » utilisés pour étudier les effets des ligands sur le comportement des récepteurs a permis de montrer que certains ligands peuvent activer des voies de signalisation distinctes avec une puissance et une efficacité différentes. En effet, plusieurs études ont permis d'observer un changement dans l'ordre du rang des puissances et/ou des réponses maximales mesurées pour une série de ligands agissant sur différentes voies signalétiques d'un même récepteur (Spengler et al., 1993; Berg et al., 1998; Kurrasch-Orbaugh et al., 2003; Gay et al., 2004; Shoemaker et al., 2005). Une des premières parmi ces études fut celle de Spengler et al. (1993), qui étudiait la production d'AMPc et d'inositol phosphate induite par les agonistes PACAP(1-27) et PACAP(1-38) du récepteur PACAP. Les deux agonistes activent ces deux voies, mais PACAP(1-27) est plus puissant que PACAP(1-38) pour la voie AMPc alors que l'inverse est vrai pour la voie d'inositol phosphate. Une telle inversion des puissances relatives (ou des réponses maximales, telle qu'observée dans d'autres études) est incompatible avec un seul état actif du récepteur pour les deux voies et suggère donc que ces agonistes stabilisent et/ou favorisent des conformations distinctes du

récepteur. Ces conformations distinctes, spécifiques à chaque ligand, peuvent donc résulter en l'activation différentielle des voies de signalisation associées au récepteur, un phénomène qui a été décrit comme la sélectivité fonctionnelle (« *functional selectivity* »), l'agonisme dirigé (« *biased agonism* »), l'efficacité dirigée par le ligand (« *ligand-biased efficacy* ») ou encore le trafic de la signalisation dirigé par le ligand (« *ligand-directed trafficking of receptor signaling* ») (Galandrin et al., 2007; Urban et al., 2007a) (Figure 8).



**Figure 8. Représentation schématique de la sélectivité fonctionnelle.**

Trois différents ligands pouvant stabiliser et/ou induire différentes conformations du récepteur sont représentés. Chaque conformation différente permet des efficacités distinctes envers différents effecteurs. Adapté de Galandrin et al. (2007).

Autre exemple de sélectivité fonctionnelle, certains ligands possèdent des efficacités opposées envers différentes voies de signalisation (Gbahou et al., 2003; Audet et al., 2005; Mukhopadhyay and Howlett, 2005; Galandrin and Bouvier, 2006). Par exemple, les ligands ICI118551 et propranolol sont des agonistes inverses pour la production d'AMPc induite par le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, mais sont des agonistes pour la voie ERK1/2 (Galandrin and Bouvier, 2006). De plus, certains ligands peuvent sélectivement activer certains comportements du récepteur, incluant ceux qui



ne sont pas nécessairement associés à une signalisation mais plutôt à sa régulation, comme la phosphorylation, la désensibilisation ou l'internalisation du récepteur (Roettger et al., 1997; Bhowmick et al., 1998; Willins et al., 1999). Le terme efficacité collatérale a été utilisé pour décrire ce phénomène, par opposition à l'efficacité linéaire habituellement observée avec le ligand endogène qui stimule séquentiellement toutes les activités du récepteur (Kenakin, 2005a). L'ensemble des observations décrites ci-dessus et obtenues en utilisant plusieurs récepteurs différents démontre donc la pluridimensionalité de l'efficacité et la nécessité d'associer l'efficacité d'un ligand à une activité précise du récepteur.

#### **1.4.4. Conformations multiples des RCPG**

La sélectivité fonctionnelle a été attribuée à la capacité de ligands de stabiliser et/ou d'induire des conformations uniques du récepteur qui ont ensuite des dispositions variables à activer différentes voies de signalisation. Bien que le lien direct entre une conformation spécifique du récepteur et le profil fonctionnel d'un ligand n'ait pas encore été établi, plusieurs études ont démontré que des ligands peuvent induire et/ou stabiliser différents états conformationnels qui leur sont propres. Ainsi, des études réalisées avec des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques purifiés et marqués de façon covalente avec une sonde fluorescente montrent que des ligands de différentes efficacités induisent des réarrangements structuraux distincts du récepteur (Gether et al., 1995; Ghanouni et al., 2001). La mesure du transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) intramoléculaire entre des sondes fluorescentes introduites au niveau de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminale du récepteur  $\alpha_{2A}$ -adrénergique a permis la détection dans des cellules vivantes des changements conformationnels opposés selon qu'un agoniste ou un agoniste inverse était utilisé pour stimuler le récepteur (Vilardaga et al., 2005). De plus, en insérant des sondes fluorescente et bioluminescente dans différentes parties des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  des protéines G hétérotrimériques ainsi qu'au C-terminal des récepteurs  $\alpha_{2A}$ -adrénergique ou opioïdes  $\delta$ , des mesures du transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) ont permis la détection de changements conformationnels

distincts (entre le récepteur et les protéines G et entre les différentes sous-unités de la protéine G) selon le ligand appliqué (Galés et al., 2006; Audet et al., 2008).

### **1.4.5. Modulateurs allostériques**

Étant donné les multiples conformations que peuvent adopter les RCPG et la sélectivité fonctionnelle qui peut en résulter, il peut être souhaitable de sélectivement activer ou inhiber des fonctions précises d'un récepteur lorsqu'elles ont un rôle à jouer dans un contexte pathologique. Au cours des dernières années, une quantité croissante de données indiquent que certaines molécules peuvent permettre à un ligand possédant une activité fonctionnelle non sélective (comme le ligand naturel endogène) de produire des effets sélectifs. Ces molécules, désignées modulateurs allostériques, agissent sur un site topographiquement distinct (site allostérique) du site de liaison du ligand endogène (site orthostérique).

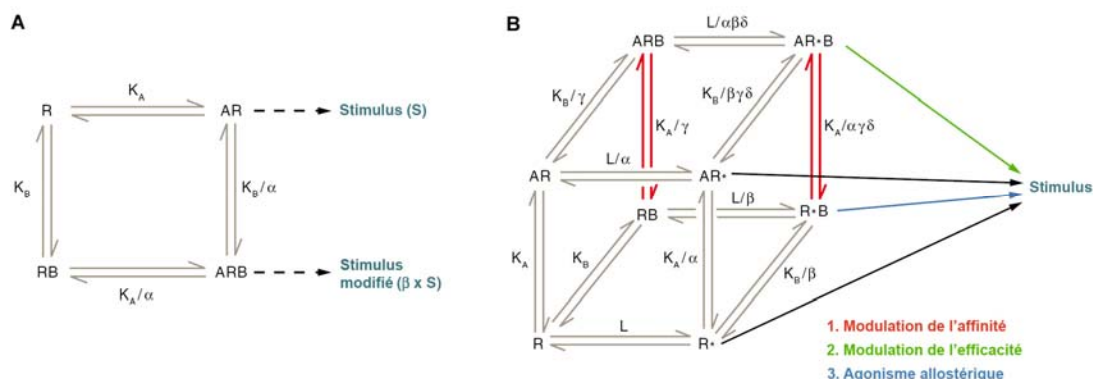
#### **1.4.5.1. Concepts de base et modèles théoriques**

De façon générale, l'allostérisme des protéines décrit l'effet de l'énergie que procure une molécule à un site d'une protéine sur l'interaction de cette protéine avec une autre molécule à un autre site (Kenakin, 2009a). Le terme allostérique a été introduit pour la première fois par Monod et al. Les auteurs ont d'abord suggéré que la liaison de ligands à des sites topographiquement distincts (sites allostériques) du site de liaison du substrat pouvait modifier positivement ou négativement l'activité des enzymes (Monod et al., 1963). Ils ont ensuite proposé un modèle des protéines allostériques, impliquant une organisation oligomérique, une coopérativité dans la liaison des ligands, et des changements d'états conformationnels qui pouvaient être préférentiellement sélectionnés par différents ligands (Monod et al., 1965).

Les RCPG sont donc des protéines naturellement allostériques, puisqu'ils lient des molécules dans un domaine extracellulaire et changent de conformation pour affecter des interactions protéine-protéine dans un domaine intracellulaire. La nécessité de distinguer le site de liaison du ligand naturel d'un récepteur des autres

sites de liaison topographiquement distincts a mené à l'utilisation du terme orthostérique pour désigner le site de liaison de l'agoniste endogène (Neubig et al., 2003). Un modulateur allostérique de RCPG est un ligand qui lie un site allostérique du récepteur pour augmenter ou diminuer l'efficacité et/ou l'affinité d'un ligand orthostérique. Le modulateur agit en stabilisant une nouvelle conformation allostérique (ou un ensemble limité de conformations), créant en quelque sorte un « nouveau récepteur » qui peut avoir des propriétés fonctionnelles et de liaison différentes (Kenakin, 2007a).

Tout comme les modèles théoriques d'interaction ligand orthostérique-récepteur (voir section 1.4.2 et figure 7), des modèles théoriques ont été proposés pour décrire et quantifier les interactions allostériques. Le modèle le plus simple est le modèle complexe ternaire allostérique (Ehlert, 1988) (Figure 9a). Dans ce modèle, les ligands orthostérique (A) et allostérique (B) se lient au récepteur en fonction de leurs constantes de dissociation à l'équilibre ( $K_A$  et  $K_B$ ) et du facteur de coopérativité  $\alpha$ . Ce dernier paramètre représente le changement d'affinité du ligand orthostérique lorsque le ligand allostérique est lié. Le stimulus (S) est généré par la liaison du ligand orthostérique au récepteur en présence (ARB) ou en absence (AR) du modulateur allostérique et un facteur de proportionnalité additionnel,  $\beta$ , peut être ajouté pour tenir compte des modifications de l'efficacité du ligand orthostérique par le modulateur orthostérique (May et al., 2007). De la sorte, une valeur  $\alpha$  ou  $\beta > 1$  décrit une potentialisation de l'affinité et de l'efficacité, respectivement (modulateur allostérique positif), une valeur  $< 1$  indique une inhibition (modulateur allostérique négatif) et une valeur égale à 1 indique un effet neutre. Le modèle allostérique à deux états de Hall (2000) est un modèle plus complexe qui décrit les effets des modulateurs allostériques sur l'affinité, l'efficacité et la distribution du récepteur entre états inactifs (R) et actifs ( $R^*$ ) en terme de conformations distinctes induites par les ligands selon leurs facteurs de coopérativité ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) pour les différents états (Figure 9b). Dans ce modèle, l'effet allostérique peut se manifester par la modulation de l'affinité, de l'efficacité ou encore par l'agonisme allostérique (agonisme du modulateur « ago-allostérique » en absence du ligand orthostérique).



**Figure 9. Modèles des effets fonctionnels des modulateurs allostériques.**

A) Le modèle plus simple du complexe ternaire allostérique ; B) le modèle allostérique à deux états. Adapté de May et al. (2007).

#### 1.4.5.2. Avantages

Les modulateurs allostériques offrent des avantages distincts d'un point de vue thérapeutique, et il existe présentement deux modulateurs allostériques approuvés pour usage clinique : Cinacalcet, un modulateur positif du récepteur sensible au calcium CaSR (Franceschini et al., 2003), et Maraviroc, un modulateur négatif du récepteur de chimiokine CCR5 (Dorr et al., 2005). Un des avantages des modulateurs allostériques est leur effet saturable. Puisque les modulateurs allostériques nécessitent la liaison du ligand orthostérique pour avoir un effet, une fois que tous les sites orthostériques sont occupés, il ne peut pas y avoir d'effet allostérique supplémentaire. Par conséquent, il y a plafonnement de l'effet biologique et des concentrations plus élevées de modulateur allostérique ne feront qu'augmenter la durée de l'effet sans risque de surdosage. Par opposition, pour les molécules orthostériques la durée de l'effet est liée à la magnitude de l'effet (Kenakin, 2005a). Dans le cas où le modulateur allostérique ne possède pas d'efficacité qui lui est propre, un autre avantage thérapeutique par rapport aux ligands orthostériques est que la modulation de la réponse biologique aura lieu seulement lorsque l'agoniste endogène sera

présent, et sera donc liée à la distribution physiologique de la fonction du récepteur et de son ligand naturel (May et al., 2007).

Une autre caractéristique importante des modulateurs allostériques est que leurs effets dépendent de la « sonde », cette dernière étant définie comme toute molécule qui lie le récepteur et peut servir à mesurer l'état du récepteur (Kenakin, 2005a). Puisque la liaison d'un modulateur allostérique résulte en une conformation altérée du récepteur, ce dernier peut avoir un comportement modifié envers différentes sondes. Par exemple, bien que le modulateur allostérique du récepteur de chimiokines CCR5 aplaviroc bloque la signalisation par le calcium induite par les ligands naturels CCL3 et CCL5, il n'inhibe que la liaison de  $^{125}\text{I}$ -CCL3 et n'affecte pratiquement pas la liaison de  $^{125}\text{I}$ -CCL5 (Watson et al., 2005). Les modulateurs allostériques peuvent donc avoir des effets différents sur l'affinité et l'efficacité de la sonde et peuvent ainsi engendrer de la sélectivité fonctionnelle en modulant (inhibition ou augmentation) sélectivement des voies de signalisation activées par un ligand orthostérique. Par exemple, le modulateur allostérique LP1805 change le patron d'activation du récepteur NK2 par son agoniste naturel neurokinine A de l'activation concomitante de  $G_s$  et  $G_q$  en blocage de  $G_s$  et en léger rehaussement de l'activation de  $G_q$  (Maillet et al., 2007). Cette caractéristique, dite « permissive », peut être très intéressante dans un contexte de développement de médicaments, permettant par exemple de moduler une voie de signalisation impliquée dans une pathologie tout en laissant les autres fonctions bénéfiques intactes. Par opposition, un antagoniste orthostérique sera « non-permissif », puisqu'en compétitionnant avec l'agoniste pour l'occupation d'un même site de liaison il bloquera toutes les activités du récepteur (Kenakin, 2005a).

#### **1.4.5.3. Utilisation de peptides comme modulateurs allostériques**

Les boucles extracellulaires sont importantes pour la liaison de plusieurs modulateurs allostériques à différents RCPG, tel que les récepteurs d'acétylcholine muscarinique (mACh) dont le site allostérique commun à plusieurs modulateurs allostériques a été localisé au niveau des boucles extracellulaires 2 et 3 et à la partie

supérieure du domaine TM7 (May et al., 2007). De plus, il existe plusieurs anticorps capables de lier les boucles extracellulaires de divers RCPG (adrénergique  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , acétylcholine muscarinique  $M_1$  et  $M_2$ , angiotensine  $AT_1$ , sérotonine 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>4c</sub>) pour produire des effets allostériques (May et al., 2007). Ces observations sont en accord avec le rôle important que les boucles extracellulaires et les portions extracellulaires des domaines TM jouent dans la pharmacologie globale des RCPG (Cherezov et al., 2007) et avec l'existence d'un couplage conformationnel entre la surface extracellulaire et le site de liaison orthostérique (Bokoch et al.), faisant de ces régions des cibles logiques pour le développement de modulateurs allostériques. D'ailleurs, il y a accumulation d'évidences que des peptides ciblant ou dérivés de différentes régions extracellulaires ou juxtamembranaires de RCPG, distinctes du site de liaison orthostérique, peuvent moduler la fonction du récepteur correspondant, tel que démontré par exemple pour les récepteurs de vasopressine de type 2 (Rihakova et al., 2009), de prostaglandine  $F_{2\alpha}$  (Peri et al., 2002; Goupil et al., 2010), de dopamine  $D_2$  (Mandell et al., 2003), muscarinique  $M_1$  (Selz et al., 2004) et  $\beta_2$ -adrénergique (Hebert et al., 1996). De façon plus détaillée, dans le cas du récepteur de vasopressine V2R, un hexapeptide a été dérivé de la jonction de la première boucle extracellulaire et du domaine TM3. Le peptide (CRAVKY, désigné VRQ397) s'avère être un modulateur allostérique négatif avec des propriétés pharmacologiques permissives, inhibant la production de  $PGI_2$  induite par la stimulation du V2R, mais n'ayant pas d'effet sur la production d'AMPc ou le recrutement de la  $\beta$ -arrestine; *in vivo*, le peptide démontre des propriétés aquarétiques (Rihakova et al., 2009). Dans le cas du récepteur de prostaglandine  $F_{2\alpha}$  FP, un octo-D-peptide (ilghrdyk, désigné THG113) dérivé de la jonction du domaine TM4 et de la deuxième boucle extracellulaire et possédant des propriétés allostériques inhibe la production d'inositol phosphate induite par la  $PGF_{2\alpha}$  et a des effets tocolytiques *in vivo* (Peri et al., 2002). De plus, un peptidomimétique dérivé de THG113, le composé PDC113.824, induit une sélectivité fonctionnelle du ligand endogène, modulant positivement la signalisation associée à  $G\alpha_q$  et négativement la signalisation dépendante de  $G\alpha_{12}$  (Goupil et al., 2010).

L'utilisation de peptides thérapeutiques attire de plus en plus l'attention de l'industrie pharmaceutique, principalement dû aux améliorations apportées face aux

problèmes comme la courte demi-vie et la biodisponibilité des peptides. En effet, bien que la courte demi-vie soit un problème associé à la protéolyse des peptides natifs, l'utilisation de D-peptides et de peptidomimétiques comportant des acides aminés non naturels et des modifications chimiques comme l'acylation et la polyéthylène glycolation (PEGylation) permettent d'éviter ce problème (Nestor, 2009). Aussi, l'isomérisation de peptides en configuration « rétro-inverso » (un peptide de séquence inversée composé d'acides aminés D) permettrait d'obtenir des peptides résistants à la dégradation protéolytique tout en conservant une topologie des chaînes latérales similaire à celle du L-peptide correspondant (Goodman and Chorev, 1979). Finalement, les problèmes de biodisponibilité peuvent être contournés par l'utilisation de nouvelles voies d'administration (intranasal, inhalation) ou par des formulations injectables formant des dépôts. Certains courts peptides (D-octopeptides) hydrophiles peuvent aussi être directement absorbés au niveau de l'intestin suite à une administration orale chez le rat (Pappenheimer et al., 1997).

#### **1.4.5.4. Peptide THG213.29**

Le peptide THG213.29 [L-(4,4)-biphényl alanine-(D)-tsyea-(L)-LKK] utilisé dans le cadre de cette étude est un dérivé du peptide THG213 (composé des acides aminés D « iftsyecl ») (Figure 1, article 2). Ce dernier est dérivé de la séquence inverse (carboxyle vers amino-terminal) de la jonction du premier domaine extracellulaire et du troisième domaine transmembranaire du récepteur de prostaglandine EP<sub>4</sub>. La séquence du peptide THG213.29 a été obtenue suite à une série de modifications du peptide THG213. Les différentes variantes du peptide ont été testées pour leurs effets sur la vasodilatation de la veine saphène du porc et/ou sur le taux de filtration glomérulaire chez le rat, tel que décrit dans l'article 2 de cette thèse. La solubilité des peptides dans l'eau a aussi été considérée. Le peptide THG213.29 avait les caractéristiques globales les plus intéressantes et a été sélectionné pour une caractérisation plus poussée. Par rapport au peptide original THG213, le résidu phénylalanine a été remplacé par un acide aminé synthétique similaire (L-(4,4)-biphényl alanine) qui a produit de meilleurs résultats, le résidu

cystéine qui peut former des ponts disulfures avec d'autres cystéines a été remplacé par un résidu alanine et deux résidus lysine ont été ajoutés pour augmenter la solubilité du peptide.



## 2. Le récepteur de prostaglandine E<sub>2</sub> de type EP<sub>4</sub>

La prochaine section décrira le récepteur utilisé dans cette étude, soit le récepteur EP<sub>4</sub>, dont le ligand naturel est la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Le récepteur EP<sub>4</sub> est impliqué dans plusieurs pathologies et la modulation de ses actions pourrait trouver des applications cliniques. La signalisation d'EP<sub>4</sub> s'avère complexe et des voies distinctes peuvent être impliquées dans les effets cliniquement pertinents du récepteur, d'où l'intérêt d'étudier la sélectivité fonctionnelle de ses ligands et de développer des modulateurs de ses activités.

### 2.1. Les prostaglandines

#### 2.1.1. Structure et nomenclature

Les prostaglandines font partie du groupe des prostanoïdes, des médiateurs lipidiques qui sont des acides gras oxygénés composés de vingt atomes de carbone, comprenant un cycloalcane, une double liaison *trans* entre les carbones 13 et 14 ainsi qu'un groupement hydroxyl au carbone 15 (Bos et al., 2004). Les prostanoïdes peuvent être divisés en thromboxanes (TX) qui possèdent un cyclohexane, et prostaglandines (PG) qui possèdent un cyclopentane. Le nom "prostaglandine" dérive du mot prostate et a été attribué par Ulf von Euler en 1935 pour désigner le composé actif présent dans des extraits de la prostate et de la vésicule séminale qui, lorsqu'injecté dans des animaux, diminuait leur pression sanguine (von Euler, 1935). Les prostaglandines peuvent être classées en types A à I selon les modifications de l'anneau cyclopentane; les types A, B et C ne sont toutefois pas naturels et résultent d'artefacts d'extraction. Un indice suivant l'abréviation indique le nombre de double liaisons présentes dans les chaînes latérales attachées au cyclopentane (par exemple : PGE<sub>2</sub>). Selon le nombre de doubles liaisons présentes, les prostanoïdes peuvent ainsi être classés en séries 1, 2 et 3, qui sont respectivement synthétisés à partir d'acide  $\gamma$ -homolinolénique, d'acide arachidonique et d'acide timodonique. Chez la plupart des

animaux, la série 2 de prostanoïdes est de loin la plus abondante (Coleman et al., 1994b).

### 2.1.2. Biosynthèse et transport

Chez les mammifères, les prostanoïdes sont principalement formés à partir de l'acide arachidonique, un acide gras insaturé à 20 carbones qui est estérifié aux glycérophospholipides de la membrane plasmique. Différents stimuli physiologiques ou pathologiques peuvent induire l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (principalement) ou de la combinaison de la phospholipase C et de la diglycéride lipase, menant à la libération de l'acide arachidonique de la membrane (Smith et al., 1991). L'acide arachidonique est ensuite oxydé en PGG<sub>2</sub> puis réduit en PGH<sub>2</sub>, un endoperoxyde instable. Ces deux réactions enzymatiques sont catalysées par la cyclo-oxygénase (COX), qui comprend deux isoformes : COX-1, qui est exprimée constitutivement dans la plupart des types cellulaires et COX-2 dont l'expression peut être fortement induite par des agents pro-inflammatoires (Tilley et al., 2001). La PGH<sub>2</sub> sert ensuite de substrat à différentes synthases exprimées spécifiquement dans différents types cellulaires pour mener à la formation des cinq prostanoïdes bioactifs : PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostacycline) et TXA<sub>2</sub> (thromboxane) (Figure 10). Parmi ces derniers, la PGE<sub>2</sub> est la plus abondamment produite dans le corps humain. Une fois produits, les prostanoïdes ont une courte demi-vie (de secondes à minutes) puisqu'ils sont rapidement métabolisés en produits inactifs par hydratation ou oxydation (Smyth and FitzGerald, 2007).

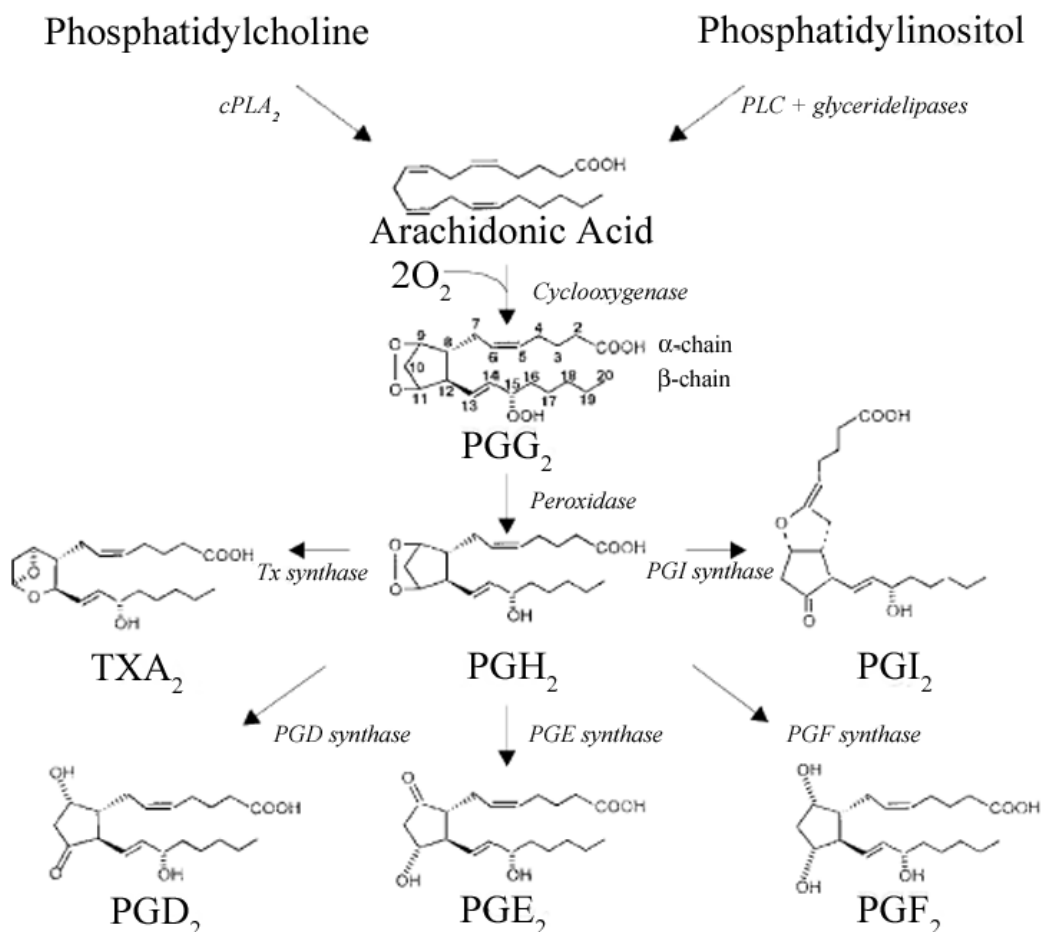
Les prostaglandines sont produits de façon ubiquitaire et agissent localement de façon autocrine ou juxtacrine pour moduler plusieurs systèmes physiologiques, tels que les systèmes cardiovasculaire, immunitaire, respiratoire, gastro-intestinal, nerveux, génito-urinaire, et endocrine. Ils sont aussi impliqués dans plusieurs pathologies comme le cancer, l'inflammation, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Hata and Breyer, 2004). L'importance physiologique des prostaglandines est mise en évidence par l'utilisation abondante en clinique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (comme l'acide acétylsalicylique et l'ibuprofène) et

de l'acétaminophène qui agissent comme inhibiteurs non-spécifiques des COX. De plus, certaines prostaglandines ou leurs dérivés synthétiques sont couramment utilisés en clinique : alprostadil ( $\text{PGE}_1$ ) pour le maintien de l'ouverture du canal artériel chez les nouveaux-nés en attente de chirurgie cardiaque et pour le traitement de l'impotence ; misoprostol (dérivé de la  $\text{PGE}_1$ ) pour la prévention des ulcères gastro-duodénaux et pour induire l'avortement ;  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pour induire le travail lors d'un accouchement ; latanoprost (dérivé de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) pour le traitement de glaucomes chroniques ; et prostacycline pour le traitement de l'hypertension pulmonaire (Smyth and FitzGerald, 2007).

On a longtemps pensé que les prostaglandines diffusaient vers le milieu extracellulaire dû à leur nature lipophile. Il est maintenant démontré que les prostaglandines peuvent être activement exportées de la cellule par l'action du transporteur MRP4 (*multidrug resistance protein 4*) (Reid et al., 2003). De plus, plusieurs transporteurs d'anions organiques, dont le mieux caractérisé est le PGT (*prostaglandin transporter*), peuvent importer les prostaglandines dans la cellule (Schuster, 2002).

## 2.2. Famille des récepteurs de prostanoïdes

Une fois relâchés, les prostanoïdes peuvent se lier à leur récepteur spécifique pour engendrer leurs effets physiologiques. Les récepteurs de prostanoïdes ont tout d'abord été caractérisés par analyse pharmacologique, indiquant la présence de huit récepteurs dont la nomenclature est basée sur le ligand qui lie le récepteur avec le plus d'affinité. Ainsi, le récepteur DP lie la  $\text{PGD}_2$ , FP la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , IP la  $\text{PGI}_2$  et TP le thromboxane, tandis que quatre récepteurs différents ( $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  et  $\text{EP}_4$ ) lient la  $\text{PGE}_2$ . Bien que chaque prostaglandine lie son récepteur associé avec le plus d'affinité, la liaison de certains prostanoïdes avec d'autres récepteurs de la famille est aussi observée (Breyer et al., 2001); plusieurs composés synthétiques dérivés de la structure des prostaglandines ont aussi été développés au fil des années, mais la plupart ne sont pas spécifiques pour un seul récepteur de la famille (Tableau 2).



**Figure 10. Biosynthèse des prostanoïdes.**

L'acide arachidonique, libéré de la membrane plasmique par l'action de phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), phospholipase C (PLC) ou glycéride lipases, est métabolisé par la cyclo-oxygénase-1 ou 2 en PGH<sub>2</sub>. Différentes synthases spécifiques génèrent ensuite les prostanoïdes bioactifs TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et PGI<sub>2</sub>. Tiré de Bos et al. (2004).

<b>Ligand</b>	<b>EP<sub>1</sub></b>	<b>EP<sub>2</sub></b>	<b>EP<sub>3</sub></b>	<b>EP<sub>4</sub></b>	<b>DP</b>	<b>FP</b>
PGE <sub>2</sub>	9.1	4.9	0.33	0.79	307	119
PGE <sub>1</sub>	36 *	10 *	1.1 *	1.45	>10000 *	>10000 *
PGD <sub>2</sub>	5820	2973	421	1483, 2139	1.7	6.7
PGF <sub>2α</sub>	547	964	38	288, 433	861	3.2
Butaprost (AL)	>10000	91	1643	>10000	12097	>10000
L-902688	>10000	3200	2800	0.38	4800	>8000
M&B28767	419	988	0.14	10	>10000	510
Misoprostol (AL)	>10000	34	7.9	23	>10000	>10000
11-deoxy PGE <sub>1</sub>	600 *	45 *	1.5 *	1.36	>10000 *	>10000 *
16,16 dimethyl PGE <sub>2</sub>	>10000 *	17 *	1.9 *	43 *	>10000 *	350 *
17-phenyl PGE <sub>2</sub>	14 *	>10000 *	3.7 *	34.5	>10000 *	60 *
PGE <sub>1</sub> alcool	>10000 *	>10000 *	330 *	190 *	>10000 *	>10000 *
Sulprostone	107	>10000	0.35	7740	>10000	198

**Tableau 2. Affinité de liaison de ligands à des récepteurs de prostaglandine recombinants.**

Les valeurs  $K_i$  (nM) représentent l'affinité de liaison pour des récepteurs humains, à l'exception des données suivies d'un astérisque qui ont été déterminées avec des récepteurs murins. AL : forme acide libre. Données tirées de : (Kiriya et al., 1997; Abramovitz et al., 2000; Davis and Sharif, 2000; Young et al., 2004).

Le clonage de l'ADNc des récepteurs de prostanoïdes a permis leur identification moléculaire, révélant que ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires faisant partie de la famille de la rhodopsine des RCPG. Ces récepteurs affichent 20-30% d'homologie entre eux et possèdent une vingtaine d'acides aminés conservés et uniques à la famille des récepteurs de prostanoïdes; ces résidus conservés sont majoritairement situés dans les segments transmembranaires et la deuxième boucle extracellulaire des récepteurs. Le clonage d'ADNc a aussi mis en

évidence la présence de plusieurs variantes du récepteur EP<sub>3</sub>, résultant de l'épissage alternatif de la queue C-terminale du récepteur. De plus, un neuvième récepteur de prostanoïde liant la PGD<sub>2</sub> mais faisant plutôt partie de la famille des récepteurs chimioattractants a été identifié en 2001 (Hirai et al., 2001): CRTH2 (*chemoattractant homologous receptor expressed on Th2 cells*, aussi désigné DP<sub>2</sub>). Les récepteurs de prostanoïdes signalisent par les voies classiques associées aux protéines G hétérotrimériques, et l'ensemble des voies induites suite à l'activation des récepteurs de prostanoïdes et les effets biologiques qui s'ensuivent sont complexes. Un résumé du couplage de ces récepteurs et des principales voies de signalisation associées est présenté dans le tableau 3.

Classe	Sous-type	Protéine G	Signalisation
PGE <sub>2</sub>	EP <sub>1</sub>	G <sub>q</sub>	↑Ca <sup>2+</sup>
	EP <sub>2</sub>	G <sub>s</sub>	↑AMPc, transactivation EGFR, GSK-3
	EP <sub>3</sub>	G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	↓AMPc, ↑AMPc, ↑IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> (selon variant d'épissage)
	EP <sub>4</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>i</sub>	↑AMPc, PI3K, ERK1/2, GSK-3, transactivation EGFR
PGD <sub>2</sub>	DP	G <sub>s</sub>	↑AMPc, ↑Ca <sup>2+</sup>
	CRTH2	G <sub>i</sub>	↓AMPc, ↑Ca <sup>2+</sup> , PLC, PI3K, MAPK
PGF <sub>2α</sub>	FP	G <sub>q</sub>	↑IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> , Rho, transactivation EGFR, GSK-3
PGI <sub>2</sub>	IP	G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub>	↑AMPc, ↑IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> , ↓AMPc
TXA <sub>2</sub>	TP	G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>i</sub>	↑IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> , ↑AMPc

**Tableau 3. Propriétés pharmacologiques des récepteurs de prostanoïdes.**

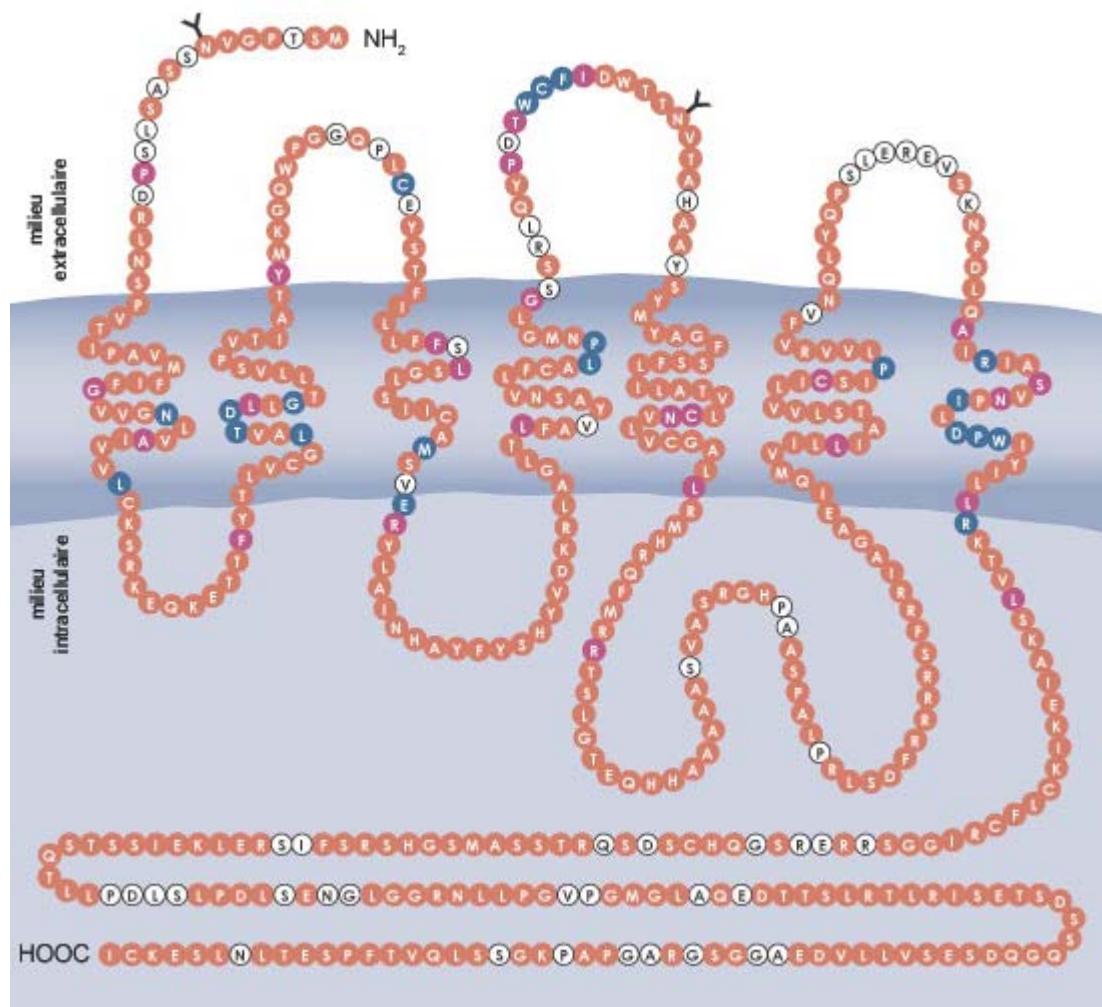
Les récepteurs EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub> sont exprimés dans la plupart des tissus, mais la distribution d'EP<sub>1</sub> et EP<sub>2</sub> est plus limitée (Sugimoto and Narumiya, 2007). De plus, la présence des récepteurs EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub> a aussi été démontrée à la membrane périnucléaire de différents types cellulaires; la stimulation de ces récepteurs sur des noyaux isolés entraîne la modulation des niveaux de calcium intranucléaire et la transcription de certains gènes (Bhattacharya et al., 1998; Bhattacharya et al., 1999).

### **2.3. Le récepteur EP<sub>4</sub>**

Le récepteur EP<sub>4</sub> humain est composé de 488 acides aminés. Il se distingue des autres récepteurs de prostanoïdes par une longue queue C-terminale intracellulaire de 156 acides aminés, dont 38 résidus sérine et thréonine qui pourraient servir de sites de phosphorylation multiple (Figure 11). Il possède aussi deux sites potentiels de N-glycosylation et deux cystéines (C346 et C349) qui pourraient être palmitoylées dans la portion proximale de la queue C-terminale. L'ARNm du récepteur EP<sub>4</sub> est exprimé à différents degrés dans la plupart des tissus : intestin grêle, iléon, poumon, thymus, rein, utérus, pancréas, rate, cœur, estomac, cerveau, et cellules mononuclées du sang périphérique (An et al., 1993; Honda et al., 1993; Bastien et al., 1994; Mori et al., 1996).

#### **2.3.1. Importance physiologique et physiopathologique**

Au cours des quinze dernières années, la génération de souris dans lesquelles le gène du récepteur EP<sub>4</sub> a été invalidé (EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup>) et le développement de ligands sélectifs pour EP<sub>4</sub> ont permis de mieux distinguer le rôle physiologique et physiopathologique de ce récepteur. La perte du récepteur EP<sub>4</sub> n'est pas létale *in utero*, mais la plupart des nouveau-nés meurent dans les 72h suivant leur naissance dû à un canal artériel persistant, et seules 5% des souris d'un fond génétique mixte survivent (Nguyen et al., 1997). Le canal artériel est un court vaisseau permettant au sang de l'artère pulmonaire de rejoindre l'aorte sans passer par les poumons pendant



**Figure 11. Représentation schématique du récepteur EP<sub>4</sub> humain.**

Les résidus homologues au récepteur EP<sub>4</sub> murin sont colorés en orange, les résidus conservés parmi les récepteurs de prostanoïdes humain sont colorés en bleu et les résidus conservés parmi les récepteurs EP humains sont colorés en rose. Les sites de N-glycosylation potentiels sont indiqués par le symbole « Y ». Tiré de Cayman Chemical Company ([www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)).



la vie intra-utérine, et l'activation du récepteur EP<sub>4</sub> permet sa fermeture à la naissance.

Différentes études, détaillées ci-dessous, ont permis de montrer que le récepteur EP<sub>4</sub> est une cible pharmacologique intéressante dans plusieurs pathologies, et selon le contexte, la stimulation ou l'inhibition d'EP<sub>4</sub> pourrait potentiellement être bénéfique :

- Le rôle d'EP<sub>4</sub> dans la formation osseuse a été démontré par l'utilisation de souris EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup> chez lesquelles une diminution de la formation de nodules minéralisés en réponse à la PGE<sub>2</sub> a été observée (Yoshida et al., 2002). De plus, l'administration d'un agoniste sélectif d'EP<sub>4</sub> (mais pas des autres récepteurs EP) stimule la formation osseuse dans des souris de type sauvage et prévient la perte osseuse en plus de rétablir la masse osseuse dans des souris immobilisées ou ayant subi une ovariectomie (Yoshida et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc que l'activation d'EP<sub>4</sub> pourrait être bénéfique dans des cas d'ostéoporose.

- EP<sub>4</sub> joue aussi un rôle important dans la progression de différents cancers. Dans un modèle murin de cancer du colon induit par l'azoxyméthane, les souris EP<sub>1</sub><sup>-/-</sup> et EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup> ont un nombre diminué de foyers de cryptes aberrantes, qui sont des lésions prénéoplasiques dans le colon. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs dans des souris de types sauvages produit des résultats similaires, tandis qu'à l'opposé l'utilisation d'agonistes spécifiques augmente le nombre de lésions prénéoplasiques (Mutoh et al., 2002). D'autre part, la stimulation d'EP<sub>4</sub> augmente la prolifération de cellules de cancer du poudon « non à petites cellules » via une augmentation de l'expression de la kinase liée aux intégrines ILK (Zheng et al., 2009). Finalement, le prétraitement de deux différentes lignées cellulaires murines de cancer du sein avec des antagonistes sélectifs d'EP<sub>4</sub> (AH23848 ou ONO-AE3-208) a diminué la formation de métastases aux poudons causées suite à l'injection de ces cellules chez des souris BALB/cByJ (Ma et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'utilisation d'antagonistes d'EP<sub>4</sub> pourrait avoir un effet préventif contre la progression et le potentiel métastatique de différents cancers, dont ceux du colon, du poudon et du sein.

- Parmi toutes les souris déficientes en récepteurs de prostanoïde dans un modèle de colite induite par sulfate de sodium dextran, seule les souris  $EP_4^{-/-}$  développent une colite sévère (Kabashima et al., 2002). L'absence d' $EP_4$  affecte l'intégrité de la muqueuse et induit une perte de l'épithélium, des dommages aux cryptes et l'agrégation des neutrophiles et lymphocytes dans le colon. L'utilisation d'agonistes d' $EP_4$  pourrait donc être bénéfique pour le traitement des affections abdominales inflammatoires.

- La  $PGE_2$  contribue à la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde, et dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde induite par anticorps anti-collagène, seules les souris  $EP_4^{-/-}$  ont une incidence et une sévérité diminuée de la maladie (McCoy et al., 2002). Plus précisément, les souris déficientes en  $EP_4$  présentent moins de destruction osseuse, de perte de protéoglycanes et de dégradation du collagène de type II dans le cartilage, et les macrophages isolés du foie produisent moins d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 comparé aux souris de type sauvage. Dans une autre étude, un antagoniste sélectif d' $EP_4$  (MF498) a inhibé l'inflammation dans un modèle d'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant chez le rat aussi efficacement qu'un inhibiteur de COX-2 (Clark et al., 2008). De plus, le MF498 était aussi efficace que l'anti-inflammatoire non stéroïdien diclofenac ou que l'inhibiteur spécifique de la PGE synthase-1 microsomale MF63 pour le soulagement de la douleur articulaire dans un modèle d'ostéo-arthrite induite par l'iodoacétate chez le cochon d'Inde (Clark et al., 2008). Ces études démontrent que des antagonistes d' $EP_4$  pourraient être efficaces pour le traitement de l'arthrite.

- Les cellules de Langherans sont des cellules présentatrices d'antigène de la peau dont la maturation et la migration vers les nœuds lymphatiques sont des étapes cruciales de l'initiation de la réponse immunitaire spécifique de la peau. Bien que les cellules de Langherans expriment les quatre récepteurs EP, seules les souris  $EP_4^{-/-}$  montrent une réduction de leur maturation et migration vers les nœuds lymphatiques (Kabashima et al., 2003). De plus, l'hypersensibilité de contact envers un antigène (un modèle des allergies de la peau) était atténuée chez les souris  $EP_4^{-/-}$  ou chez les souris de type sauvage traitées avec un antagoniste sélectif pour  $EP_4$ .

- Après une induction de l'inflammation périphérique par l'adjuvant complet de Freund chez le rat, le niveau d'expression d'EP<sub>4</sub> augmente dans les neurones de ganglion de racine dorsale; le traitement avec un antagoniste d'EP<sub>4</sub> ou l'atténuation de l'expression d'EP<sub>4</sub> par de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) mènent à une diminution de l'hypersensibilité thermique et mécanique sans changer la sensibilité à la douleur basale (Lin et al., 2006), suggérant qu'EP<sub>4</sub> est une cible pharmacologique potentielle pour le traitement de la douleur inflammatoire.

- La PGE<sub>2</sub> active EP<sub>4</sub> sur les lymphocytes T et les cellules dendritiques, ce qui induit l'inflammation immunitaire par la différenciation des cellules T<sub>H1</sub> et l'activation des cellules T<sub>H17</sub> (Yao et al., 2009). Les cellules T<sub>H1</sub> et T<sub>H17</sub> forment les deux sous-ensembles de lymphocytes T auxiliaires responsables des dommages tissulaires et de l'inflammation dans les modèles animaux de plusieurs maladies immunitaires comme la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde et les troubles liés aux allergies de la peau. L'action de différenciation des lymphocytes T<sub>H1</sub> par EP<sub>4</sub> dépend de la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K), tandis que l'action d'expansion des lymphocytes T<sub>H17</sub> dépend de la production d'AMPc. L'activation d'EP<sub>4</sub> est aussi nécessaire pour la production d'IL-23 par les cellules dendritiques activées, et ce mécanisme dépend plutôt de la voie EP<sub>4</sub>-AMPc-Epac (Yao et al., 2009). De plus, l'administration d'un antagoniste sélectif d'EP<sub>4</sub> dans des souris diminue l'accumulation de lymphocytes T<sub>H1</sub> et T<sub>H17</sub> dans les nœuds lymphatiques et supprime la progression de la maladie dans des modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (modèle de sclérose en plaque) et d'hypersensibilité de contact (modèle d'allergies de la peau). Ainsi, l'utilisation d'antagonistes d'EP<sub>4</sub> pourrait s'avérer thérapeutiquement utile pour plusieurs maladies immunitaires.

- L'inflammation et les peptides  $\beta$ -amyloïde, générés suite à la protéolyse de la protéine précurseur  $\beta$ -amyloïde par les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases, jouent un rôle important dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Il a été démontré qu'EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> stimulent la production des peptides  $\beta$ -amyloïde dans des cellules de rein embryonnaire humain HEK293 et de neuroblastome humain SH-SY5Y (Hoshino et al., 2007). La stimulation de la production des peptides  $\beta$ -amyloïde par EP<sub>2</sub> est

dépendante de l'adénylate cyclase et de la PKA, alors que celle par EP<sub>4</sub> est plutôt dépendante de l'internalisation du récepteur (Hoshino et al., 2009). De plus, l'activation de la  $\gamma$ -sécrétase est observée suite à l'activation d'EP<sub>4</sub> seulement, et EP<sub>4</sub> forme un complexe avec la  $\gamma$ -sécrétase, induit son internalisation et co-localise avec elle au niveau des endosomes tardifs (Hoshino et al., 2009). Des cellules exprimant un récepteur EP<sub>4</sub> mutant ne pouvant plus internaliser ne stimulent plus la production de peptides  $\beta$ -amyloïde suite à la stimulation par la PGE<sub>2</sub>, suggérant que l'inhibition de cette activité d'EP<sub>4</sub> pourrait être bénéfique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

- Finalement, EP<sub>4</sub> est aussi impliqué dans la régulation des fonctions rénales, tel que détaillé plus loin à la section 2.4.3.

### 2.3.2. Liaison du ligand

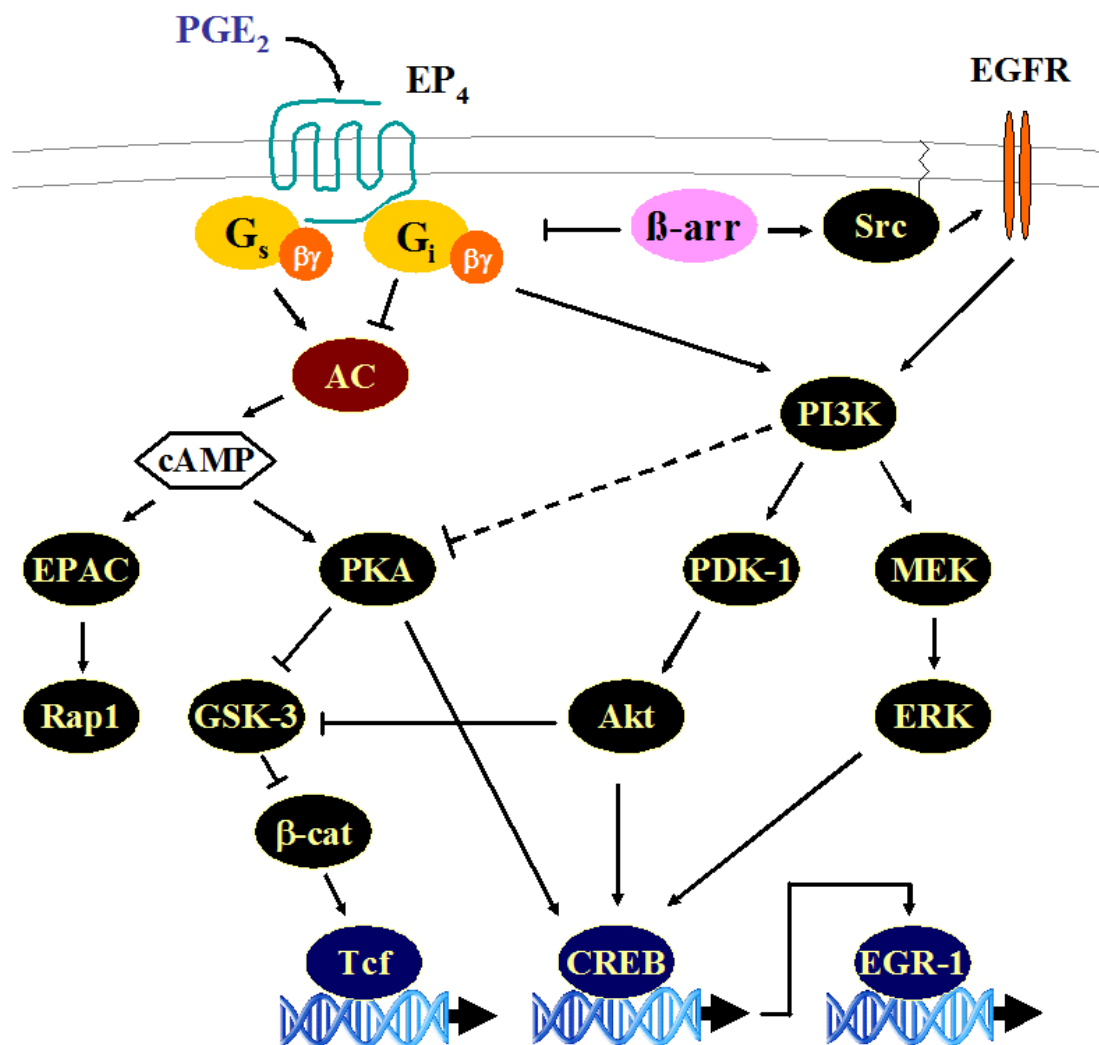
Le récepteur EP<sub>4</sub> lie la PGE<sub>2</sub> avec une grande affinité ( $K_d = 0.8$  nM), mais peut aussi lier d'autres prostaglandines naturelles avec moins d'affinité : PGD<sub>2</sub> ( $K_d = 1483-2139$  nM), PGI<sub>2</sub> ( $K_d = 8074$  nM) et PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ( $K_d = 288-433$  nM) (Abramovitz et al., 2000; Davis and Sharif, 2000). La région de liaison du ligand n'est pas précisément définie pour EP<sub>4</sub>, bien qu'on suppose par homologie avec d'autres récepteurs à petits ligands non peptidiques qu'elle est située dans le cœur hydrophobe des domaines transmembranaires à proximité de la portion extracellulaire du récepteur. En accord avec cette hypothèse, un résidu arginine situé dans le domaine TM7 près de la surface extracellulaire et conservé dans tous les récepteurs de prostanoïdes a été identifié comme critique à l'interaction du groupement carboxyl C1 des prostanoïdes avec les récepteurs EP<sub>3</sub> et IP (Audoly and Breyer, 1997; Stitham et al., 2003). De plus, quatre résidus du récepteur IP situés dans la partie supérieure des domaines transmembranaires II, III et VII (R279, F278, Y75 et F95) et requis pour la liaison de la prostacycline ont été identifiés par mutagenèse dirigée et modélisation moléculaire comme étant le domaine fonctionnel de la poche de liaison du ligand de ce récepteur (Stitham et al., 2003). D'autre part, une étude a démontré l'importance d'un résidu thréonine conservé dans la deuxième boucle extracellulaire

des récepteurs EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> pour la liaison du ligand, puisque la mutation de ce résidu en alanine (EP<sub>2</sub>T185A; EP<sub>4</sub>T168A) élimine la radioliasion du [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> (Stillman et al., 1998).

### 2.3.3. Signalisation

À l'origine, les récepteurs de PGE<sub>2</sub> ont été classés selon leurs effets sur des muscles lisses (relaxant ou contractile) et leur pharmacologie. Avant le clonage moléculaire des récepteurs EP, on croyait qu'un seul récepteur (défini pharmacologiquement comme EP<sub>2</sub>) stimulait l'adénylate cyclase. Ainsi, le premier récepteur EP couplé à G<sub>s</sub> qui a été cloné a d'abord été désigné EP<sub>2</sub> (Honda et al., 1993) avant d'être renommé EP<sub>4</sub> (Nishigaki et al., 1995) suite au clonage d'un deuxième récepteur EP également couplé à G<sub>s</sub> et ayant les propriétés pharmacologiques du type EP<sub>2</sub> (Regan et al., 1994). Les récepteurs EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> ne possèdent qu'environ 30% d'homologie et leur signalisation et régulation diffèrent. Un modèle des différentes voies de signalisation du récepteur EP<sub>4</sub> selon les connaissances actuelles est illustré à la figure 12.

Tout comme le récepteur EP<sub>2</sub>, le couplage d'EP<sub>4</sub> à G<sub>s</sub> entraîne la stimulation de l'adénylate cyclase, résultant en une augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc. L'AMPc peut ensuite activer la PKA, ce qui mène à la phosphorylation de CREB, un facteur de transcription pouvant interagir avec des éléments de réponse à l'AMPc faisant partie de certains promoteurs. La production d'AMPc suite à la stimulation d'EP<sub>4</sub> peut aussi mener à l'activation d'Epac, qui à son tour active la petite GTPase Rap1 (Yokoyama et al., 2008). De plus, l'activation de la voie AMPc/PKA par EP<sub>4</sub> peut entraîner l'augmentation de la production d'oxyde nitrique (NO) via la déphosphorylation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) dans des anneaux aortiques de souris (Hristovska et al., 2007) ou la stabilisation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) dans des cellules de cancer du sein (Timoshenko et al., 2004) et de mésangium (Lin et al., 2006) murins.



**Figure 12. Modèle des voies de signalisation du récepteur EP<sub>4</sub>.**

Le récepteur EP<sub>4</sub> est aussi capable d'activer la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Il a été démontré que l'activation de cette voie était indépendante de l'activation de la voie AMPc/PKA, mais dépendait plutôt du couplage d'EP<sub>4</sub> à une protéine G inhibitrice sensible à la PTX (G<sub>i</sub>) (Fujino and Regan, 2006). Le prétraitement avec la PTX mène aussi à une augmentation de la production d'AMPc suite à la stimulation avec la PGE<sub>2</sub> dans des cellules HEK transfectées avec EP<sub>4</sub>, indiquant que l'activation de G<sub>α<sub>i</sub></sub> pouvait aussi inhiber la signalisation AMPc-

dépendante. Dans des cellules HEK transfectées avec EP<sub>4</sub>, l'activation de la voie Gα<sub>i</sub>/PI3K mène à la phosphorylation de kinases régulées par signal extracellulaire (ERK1/2) et Akt, qui peuvent ensuite phosphoryler CREB. L'activation de CREB permet l'activation de la transcription et l'expression fonctionnelle de la protéine de réponse précoce au facteur de croissance 1 (EGR-1) (Fujino et al., 2003; Cherukuri et al., 2007). EGR-1 est un facteur de transcription de la famille doigt de zinc jouant un rôle dans plusieurs processus relatifs à la croissance et à la différenciation cellulaires. L'activation de la voie PI3K par EP<sub>4</sub> entraîne aussi l'inhibition de la PKA (Fujino et al., 2005) et de ce fait, en présence de ces deux voies de signalisation, la phosphorylation de CREB suite à la stimulation d'EP<sub>4</sub> résulte principalement de l'activation de la voie PI3K. De plus, dans des cellules HEK exprimant EP<sub>4</sub>, l'activation par la PGE<sub>2</sub> des voies PI3K et (dans une moindre mesure) AMPc/PKA mène à la stimulation des facteurs de transcription Tcf/Lef via la phosphorylation de la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) (Fujino et al., 2002). Il est intéressant de noter que l'activation de Gα<sub>i</sub> pourrait être impliquée dans le rôle (indépendant d'AMPc/PKA) d'EP<sub>4</sub> dans l'augmentation de la phosphorylation de la PI3K et de ERK1/2 et dans l'induction d'EGR-1 dans le cancer du colon (Pozzi et al., 2004; Cherukuri et al., 2007).

Le récepteur EP<sub>4</sub> est aussi capable de transactiver le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR), un récepteur à activité tyrosine kinase. Dans des cellules de carcinome colorectal, l'activation d'EP<sub>4</sub> induit le recrutement de la β-arrestine 1 au récepteur et la déphosphorylation de l'arrestine à la sérine 412, permettant son association à la tyrosine kinase c-Src. La formation du complexe de signalisation EP<sub>4</sub>/β-arrestine 1/c-Src mène à la transactivation du EGFR qui à son tour active la PI3K puis Akt, menant à une augmentation de la migration et du potentiel métastatique de ces cellules (Buchanan et al., 2006). D'autre part, dans des cellules de cancer du poumon « non à petites cellules », la stimulation d'EP<sub>4</sub> entraîne (par une voie non encore caractérisée) l'activation de la kinase liée aux intégrines (ILK) via l'augmentation de l'expression du facteur de transcription Sp1 et de son activité de liaison à l'ADN dans le promoteur d'ILK (Zheng et al., 2009).

L'activation d'ILK résulte en une phosphorylation d'ERK et de PI3K/Akt, ce qui augmente la prolifération cellulaire.

Aussi, la protéine EPRAP, possédant huit domaines de répétitions de type ankyrine mais aucun domaine catalytique ou enzymatique prévu, a récemment été identifiée comme interagissant avec la queue C-terminale d'EP<sub>4</sub> (Takayama et al., 2006). Dans des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse, EPRAP forme un complexe avec EP<sub>4</sub> et p105, un important inhibiteur cytoplasmique de NF- $\kappa$ B et de la MAPK kinase MEK. La stimulation d'EP<sub>4</sub> avec la PGE<sub>2</sub> inhibe la phosphorylation et la dégradation de p105 induite par la stimulation pro-inflammatoire des macrophages, ayant pour effet une atténuation de l'activation de NF- $\kappa$ B et de MEK et de l'activation des macrophages qui en résulterait (Minami et al., 2008).

Finalement, tel que mentionné précédemment à la section 2.3.1, EP<sub>4</sub> active la  $\gamma$ -sécrétase et induit la production de peptides  $\beta$ -amyloïde indépendamment de son activité sur l'adénylate cyclase mais de façon dépendante de la co-internalisation avec la sous-unité catalytique PS-1 de la  $\gamma$ -sécrétase (Hoshino et al., 2009).

#### 2.3.4. Régulation

L'activation d'EP<sub>4</sub> par la PGE<sub>2</sub> entraîne une désensibilisation rapide (Nishigaki et al., 1996), le recrutement des  $\beta$ -arrestines 1 et 2 et une internalisation du récepteur dépendante de la dynamine I et de la  $\beta$ -arrestine (Desai and Ashby, 2001). La longue queue C-terminale du récepteur est essentielle à sa désensibilisation (Bastepe and Ashby, 1997) et à son internalisation (Desai et al., 2000). De plus, la stimulation du récepteur entraîne sa phosphorylation dans une portion du domaine C-terminal riche en résidus sérines/thréonines (370-382) par des GRKs (Neuschafer-Rube et al., 1999; Neuschafer-Rube et al., 2004). Un autre groupe de quatre résidus sérines/thréonines (389-392) serait crucial pour l'interaction initiale de la  $\beta$ -arrestine avec le récepteur activé, alors que le site de phosphorylation principal contribuerait à la stabilisation de l'interaction récepteur-arrestine; des résidus sérine/thréonine supplémentaires situés dans la moitié distale du domaine C-terminal d'EP<sub>4</sub> seraient



nécessaires pour maximiser l'internalisation du complexe (Neuschafer-Rube et al., 2004).

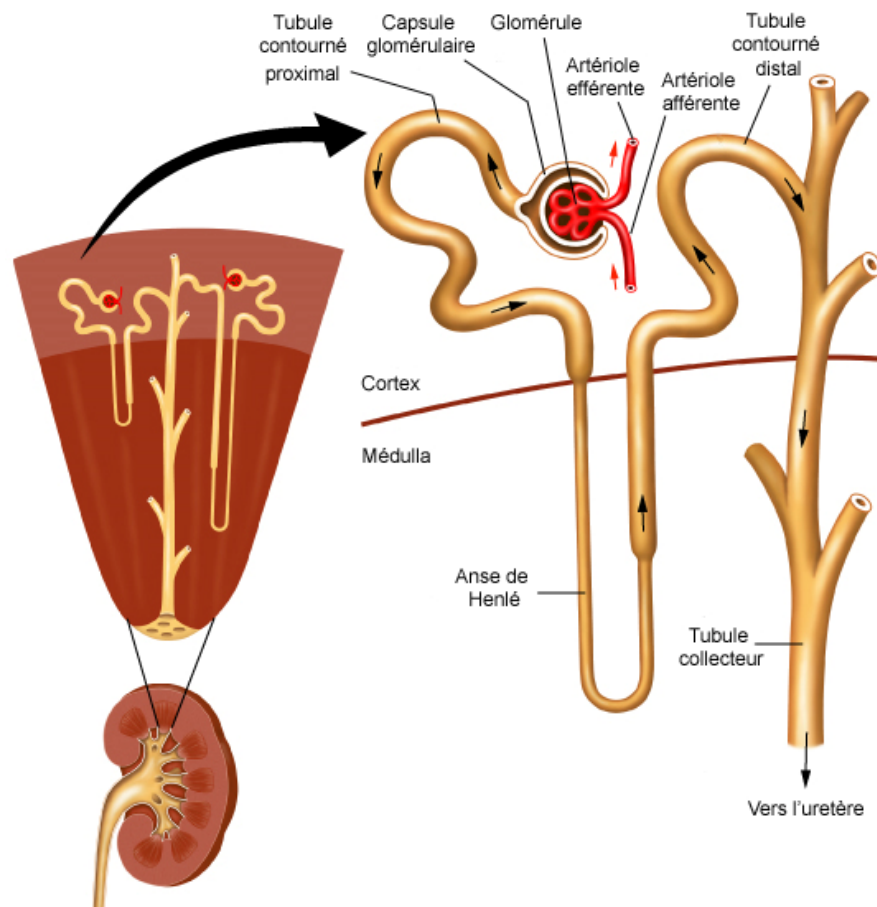
## **2.4. Rôle potentiel dans l'insuffisance rénale aiguë**

Le récepteur EP<sub>4</sub> est exprimé dans le rein et pourrait être une cible pour le traitement de l'insuffisance rénale aiguë. Dans la prochaine section, le fonctionnement normal du rein puis les causes de l'insuffisance rénale aiguë et les traitements disponibles seront d'abord décrits avant de détailler la localisation et le rôle d'EP<sub>4</sub> dans le rein.

### **2.4.1. Structure et fonction normale du néphron**

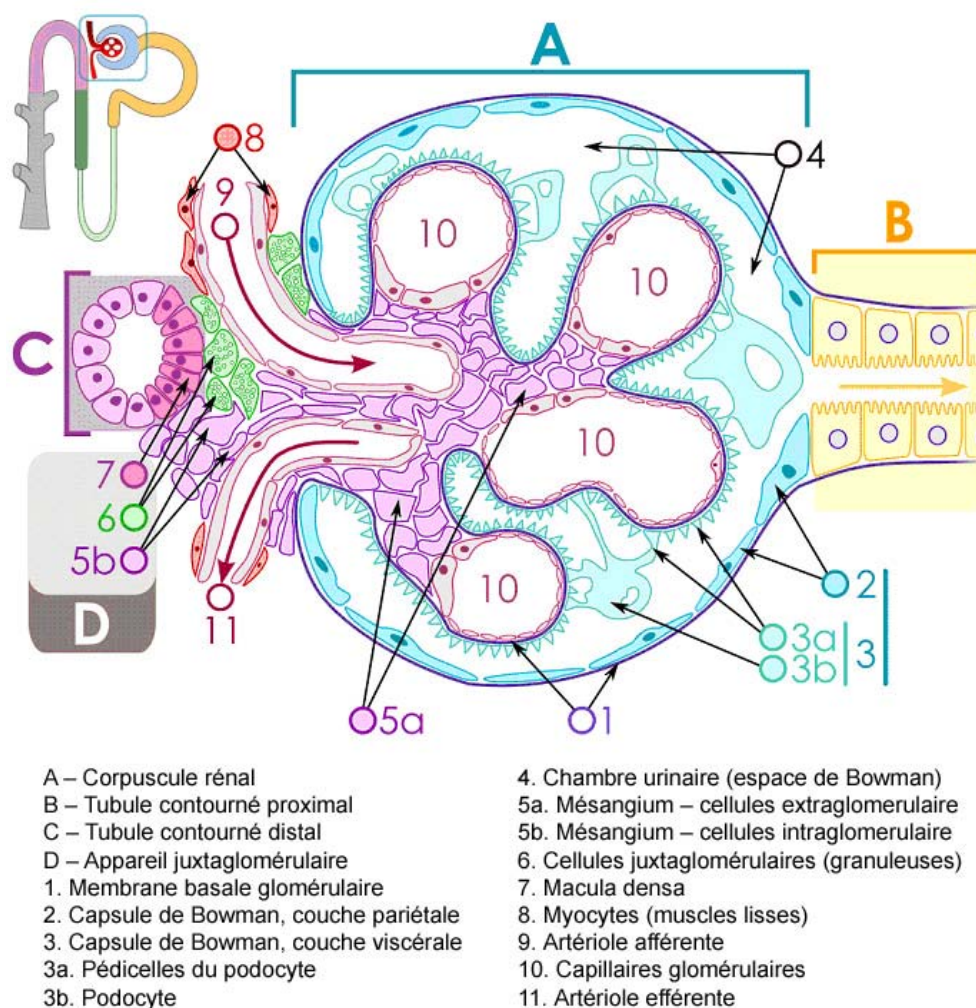
Les reins servent à purifier le sang et à équilibrer sa composition, et leur unité structurale et fonctionnelle est le néphron (Figure 13). Chaque rein humain contient environ un million de néphrons (Marieb, 1993), qui sont de petites unités de filtration du sang où se déroulent les processus menant à la formation de l'urine. Chaque néphron comprend un corpuscule rénal associé à un tubule rénal. Le corpuscule rénal est composé d'une capsule glomérulaire (ou capsule de Bowman) qui entoure complètement un amas de capillaires formant le glomérule (Figure 14). La capsule glomérulaire est formée de deux couches séparées par la chambre urinaire (ou espace de Bowman) : la couche pariétale est un épithélium formant la limite externe de la capsule, tandis que la couche viscérale est composée de podocytes, des cellules épithéliales modifiées possédant plusieurs pédicelles et qui sont étroitement associées aux capillaires glomérulaires. L'endothélium des capillaires glomérulaires est fenestré, et il forme avec la membrane basale et les fentes de filtration entre les pédicelles des podocytes la membrane de filtration. Cette dernière sert de tamis moléculaire et laisse passer passivement l'eau, le glucose, les acides aminés et les déchets azotés du plasma sanguin vers la chambre urinaire pour former le filtrat glomérulaire. Le glomérule est alimenté par l'artériole afférente et drainé par l'artériole efférente qui est de plus petit diamètre, et la pression hydrostatique

artérielle (la pression sanguine glomérulaire) permet la filtration du liquide et des solutés du sang vers la chambre urinaire. La pression hydrostatique glomérulaire (55 mm Hg) s'oppose aux pressions osmotique glomérulaire (30 mm Hg) et hydrostatique capsulaire (10 mm Hg), résultant en une pression nette de filtration positive (10 mm Hg) (Marieb, 1993).



**Figure 13. Situation et structure des néphrons.**

Un agrandissement d'un lobe rénal montre la situation des néphrons dans le rein et un deuxième agrandissement montre le schéma d'un néphron et de ses différentes composantes. Adapté de UpToDate ([www.utdol.com](http://www.utdol.com)).



**Figure 14. Schéma détaillé d'un corpuscule rénal.**

Tiré de Wikimedia Commons ([commons.wikimedia.org](https://commons.wikimedia.org)).

À la sortie du corpuscule rénal, le filtrat se dirige dans le tubule contourné proximal qui est très sinueux, puis dans l'anse de Henlé qui est allongée et en forme de U, dans le tubule contourné distal qui est aussi sinueux et finalement dans le tubule rénal collecteur (Figure 13). Chaque segment du tubule est spécialisé dans la réabsorption et/ou la sécrétion de différentes substances. Ainsi, l'eau, le glucose, les acides aminés, les vitamines et de nombreux ions peuvent être réabsorbés de façon

passive ou active vers des capillaires péri-tubulaires ou la vasa recta (vaisseaux à paroi mince entourant l'anse de Henlé) et au final, 99% du filtrat glomérulaire sera réabsorbé et renvoyé dans le sang (Marieb, 1993). Certaines substances du filtrat ne sont cependant que partiellement réabsorbées, les plus importantes étant l'urée et l'acide urique, qui sont des produits azotés du métabolisme des protéines et des acides nucléiques; la créatinine, qui provient du métabolisme musculaire, n'est quant à elle pas du tout réabsorbée et peut servir d'indice à la fonction glomérulaire (Perrone et al., 1992). Finalement, d'autres substances sont plutôt sécrétées dans le filtrat, telles que des ions  $H^+$  et  $K^+$ , la créatinine et l'ammoniac.

Chaque néphron comprend aussi un appareil juxta-glomérulaire situé au point de contact entre l'artériole afférente et le tubule contourné distal (Figure 14). Il est composé des cellules de la macula densa, des cellules juxta-glomérulaires (ou cellules granuleuses) et des cellules du mésangium extra-glomérulaire. Il permet entre autre la sécrétion de la rénine, impliquée dans le système rénine-angiotensine qui régule la pression sanguine.

Le paramètre le plus utilisé pour mesurer la fonction rénale est le débit de filtration glomérulaire (DFG), qui correspond à la quantité de liquide filtrée du sang à la chambre urinaire par minute. Le DFG est directement proportionnel à la pression nette de filtration et chez les humains adultes, il est normalement de 120-125 ml/min (180 l/jour) (Marieb, 1993). Une des méthodes utilisées pour le mesurer est par la clearance de l'inuline. L'inuline est un polysaccharide non-endogène qui passe librement à travers la membrane de filtration glomérulaire et qui n'est pas réabsorbé, sécrété, ou métabolisé par le rein (Lote, 2000). Le taux d'excrétion de l'inuline dans l'urine est donc proportionnel au DFG et ce dernier peut être calculé par la formule :

$$\text{DFG (ml/min)} = \frac{\text{Concentration inuline urine}}{\text{Concentration inuline plasma}} \times \text{Flux urinaire (ml/min)}$$

Chez les patients en clinique, le niveau de créatinine dans le sérum et le volume d'urine sont aussi souvent utilisés comme paramètres de la fonction rénale (Venkataraman and Kellum, 2007a). Un autre paramètre rénal pouvant être mesuré est le débit plasmatique rénal (DPR), qui correspond à la quantité de plasma sanguin

qui perfuse les reins par minute. Le DPR est souvent mesuré en utilisant le para-aminohippurate (PAH), qui est filtré par le glomérule et n'est pas réabsorbé dans le tubule; le PAH qui n'est pas filtré et qui se retrouve ensuite dans les capillaires péri-tubulaires est pratiquement sécrété au complet par les cellules tubulaires vers la lumière du tubule (Lote, 2000). La clearance rénale du PAH est donc un bon estimé du DPR, selon la formule :

$$\text{DPR (ml/min)} = \frac{\text{Concentration PAH urine}}{\text{Concentration PAH plasma}} \times \text{Flux urinaire (ml/min)}$$

#### 2.4.2. L'insuffisance rénale aiguë

L'insuffisance rénale aiguë est une complication médicale grave associée à de hauts taux de morbidité et de mortalité et à des coûts élevés, et elle a un effet indépendant sur le risque de mort (de Mendonca et al., 2000; Kellum and Angus, 2002). L'IRA est caractérisée par un déclin abrupt et soutenu des fonctions rénales, menant à une accumulation de toxines urémiques et de déchets azotés tels que l'urée et la créatinine (Venkataraman and Kellum, 2007b). Les symptômes cliniques comprennent habituellement une diminution du DFG et de la production d'urine ainsi qu'une augmentation de la créatinine dans le sérum (Venkataraman and Kellum, 2007a). Selon la sévérité et la durée de la dysfonction rénale, d'autres désordres métaboliques peuvent aussi survenir, tels que l'acidose métabolique, l'hyperkaliémie, des variations dans l'équilibre des fluides corporels ou encore des effets sur d'autres organes du corps (Lameire et al., 2005).

Jusqu'à tout récemment, il n'y avait pas de consensus sur la définition biochimique précise de l'IRA, de sorte que selon la définition utilisée, l'IRA peut affecter 1 à 25% des patients de l'unité des soins intensifs et mener à des taux de mortalité de 15 à 60% (Kellum, 2008). Récemment, un consensus a été établi pour proposer une définition de l'IRA et un système de classification de la sévérité du syndrome. L'acronyme RIFLE est utilisé pour décrire les classes croissantes de sévérité (R : *risk* (risque de dysfonction), I : *injury* (lésion), F : *failure* (insuffisance))

et les deux classes d'évolution de la maladie (L : *loss* (perte de fonction rénale), E : *end-stage kidney disease* (maladie rénale terminale)) (Bellomo et al., 2004). Les trois degrés de sévérité sont définis par des changements du DFG (estimé par les niveaux de créatinine du sérum) et de la production d'urine tandis que les classes d'évolution dépendent de la durée de la perte de fonction rénale. Le terme *acute kidney injury* (AKI, lésion aiguë du rein) a par la suite été proposé pour englober le spectre complet des critères RIFLE, allant de changements mineurs des fonctions rénales à la thérapie de substitution rénale (Mehta et al., 2007).

Malgré les progrès au niveau du traitement symptomatique et des thérapies de substitution rénale accomplis au cours des dernières décennies, le taux de mortalité des patients atteints d'IRA demeure élevé. La prévention de l'IRA est actuellement limitée à l'hydratation du patient par voie intraveineuse, à la correction des facteurs externes causant de l'hypoperfusion rénale et à la minimisation de l'exposition aux agents néphrotoxiques, tandis que le traitement de l'IRA de niveau sévère demande l'usage de thérapies de substitution rénale (dialyse, hémofiltration, transplantation rénale) (Venkataraman and Kellum, 2007b). Avec les progrès accomplis quant à la compréhension de la physiopathologie de l'IRA, plusieurs agents thérapeutiques ont été développés et testés dans des modèles animaux d'IRA. Cependant, des composés pharmacologiques tels que des diurétiques de l'anse, du mannitol, des agonistes du récepteur de dopamine, le facteur natriurétique auriculaire, des antagonistes d'adénosine, du N-acétylcystéine, le facteur de croissance analogue à l'insuline et des inhibiteurs calciques se sont montrés inefficaces ou ont donné des résultats non concluants dans des essais cliniques humains (Lameire et al., 2005; Venkataraman and Kellum, 2007b).

Les causes de l'IRA peuvent être regroupées en trois catégories: pré-rénale, due à l'hypoperfusion du rein (40 à 70% des cas), intrinsèque, due aux dommages directs au parenchyme rénal (10 à 50%) et post-rénales, due à l'obstruction du flux de l'urine (10%) (Hilton, 2006). L'IRA pré-rénale peut être due à de l'hypovolémie (hémorragie, déplétion plasmatique), à un état œdémateux (défaillance cardiaque, cirrhose hépatique), à une occlusion ou sténose de l'artère rénale ou à des altérations

de l'hémodynamie rénale (par des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou des inhibiteurs de l'angiotensine II) (Hilton, 2006). Parmi les causes intrinsèques, les lésions tubulaires sont les plus communes (environ 85%), et peuvent être de nature ischémique (dus à l'hypoperfusion rénale persistante) ou néphrotoxique (dus à certaines drogues telles que les aminoglycosides, aux produits de contraste radiologiques, aux métaux lourds telle que la cisplatine ou aux pigments telle que la myoglobine) (Thadhani et al., 1996; Hilton, 2006).

Deux modèles d'IRA chez le rat ont été utilisés dans le cadre de cette thèse. Dans un premier modèle, une IRA néphrotoxique a été induite par le cisplatine. Ce dernier est un antinéoplasique utilisé pour le traitement de différents cancers, mais qui cause une toxicité rénale en fonction de la dose (Yao et al., 2007). Le cisplatine est filtré dans le glomérule et est ensuite absorbé par les cellules du tubule proximal, sur lesquelles il a un effet toxique. La cytotoxicité du cisplatine est causée par la stimulation de l'inflammation, l'augmentation de stress oxydatif et azoté (présence de formes actives oxygénées et azotées), l'induction d'apoptose/nécrose, les dommages aux mitochondries et une hypoxie, résultant en des dommages aux cellules des tubules et leur dysfonctionnement (Yao et al., 2007).

Dans un deuxième modèle, une IRA ischémique est induite chez les rats par l'occlusion de l'artère rénale suivie d'une reperfusion. L'ischémie-reperfusion cause d'abord des dommages associés à l'hypoxie, en particulier au niveau des cellules du tubule proximal : perte de polarité cellulaire, desquamation, apoptose et nécrose, fuite trans-tubulaire du filtrat glomérulaire (Bonventre and Weinberg, 2003). La reperfusion cause aussi des lésions, impliquant la génération de stress oxydatif et azoté. L'inflammation rénale, impliquant la production de cytokines et de molécules d'adhésion, une augmentation de la perméabilité vasculaire, le recrutement et l'activation de leucocytes et l'expression d'iNOS est aussi une composante importante de l'initiation et du prolongement des dommages associés à l'ischémie-reperfusion (Chatterjee, 2007; Kinsey et al., 2008).

### 2.4.3. Localisation et rôle d'EP<sub>4</sub> dans le rein

La PGE<sub>2</sub> est abondamment produite dans le rein où elle agit localement pour réguler le débit plasmatique rénal, le débit de filtration glomérulaire et la réabsorption d'eau et d'électrolytes via les quatre récepteurs EP qui sont présents dans le rein selon différents patrons d'expression (Breyer and Breyer, 2001). L'expression rénale d'EP<sub>4</sub> a surtout été localisée au niveau du glomérule et des vaisseaux pré-glomérulaires, mais aussi dans le tubule contourné distal, le tubule collecteur cortical et la vasa recta (vaisseaux médullaires) (Breyer et al., 1996; Jensen et al., 2001). EP<sub>4</sub> est aussi exprimé dans des lignées cellulaires de podocytes (Bek et al., 1999), de mésangium glomérulaire (Lin et al., 2008), et de cellules juxtaglomérulaires (Friis et al., 2005). La stimulation d'EP<sub>4</sub> par la PGE<sub>2</sub> a un effet vasodilatateur sur la vasculature rénale (Schweda et al., 2004), stimule la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires (Friis et al., 2005) et favorise la survie des podocytes (Aoudjit et al., 2006). De plus, Vukicevic et al. (2006) ont récemment montré que l'utilisation d'un agoniste spécifique du récepteur EP<sub>4</sub> diminuait les dommages néphrotoxiques et augmentait le taux de survie dans un modèle néphrotoxique d'IRA induite par le chlorure de mercure chez le rat. Dans une autre étude, un agoniste spécifique d'EP<sub>4</sub> a permis de prévenir le développement de la glomérulonéphrite dans un modèle murin (Nagamatsu et al., 2006). La modulation des activités du récepteur EP<sub>4</sub> serait donc potentiellement utile pour le traitement de certaines pathologies rénales, dont l'IRA.



## OBJECTIFS DE LA THÈSE

- 1) **Étude de la sélectivité fonctionnelle de ligands naturels et synthétiques du récepteur de prostaglandine EP<sub>4</sub>** : Établir la puissance et l'efficacité d'une série de ligands du récepteur EP<sub>4</sub> pour l'activation de trois voies distinctes ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$  et  $\beta$ -arrestine) relativement au ligand endogène PGE<sub>2</sub> dans des cellules vivantes à l'aide de la technique du BRET.
- 2) **Étude des propriétés pharmacologiques d'un nouveau modulateur peptidique du récepteur EP<sub>4</sub>** : Évaluer l'effet d'un modulateur peptidique dérivé d'une région juxtamembranaire du récepteur EP<sub>4</sub> dans des modèles d'insuffisance rénale aiguë induite par la cisplatine ou l'occlusion des artères rénales chez le rat et caractériser le mode d'action du peptide sur les propriétés de liaison et de signalisation de la PGE<sub>2</sub>.

## RÉSULTATS

## **Article 1**

### **Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor ligands**

**Sélectivité fonctionnelle de ligands naturels et synthétiques du récepteur de prostaglandine EP<sub>4</sub>**

**Martin Leduc**, Billy Breton, Céline Galés, Christian Le Gouill, Michel Bouvier, Sylvain Chemtob et Nikolaus Heveker.

*J Pharmacol Exp Ther* 2009; **331**: 297-307.

Réimprimé avec la permission de la American Society for  
Pharmacology and Experimental Therapeutics. Tous droits réservés.  
Copyright © 2009 The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

**Functional selectivity of natural and synthetic  
prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor ligands**

Martin Leduc, Billy Breton, Céline Galés, Christian Le Gouill, Michel Bouvier,  
Sylvain Chemtob and Nikolaus Heveker

Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4,  
Canada (M.L., B.B., C.G., C.L.G., M.B., N.H.);

Research Center/CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada (M.L.,  
S.C., N.H.);

Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4,  
Canada (S.C.);

CIHR Team in GPCR allosteric regulation, (M.L., B.B., C.L.G., M.B., S.C., N.H.).

**Running Title:** Functional selectivity of EP<sub>4</sub> ligands

**Correspondence :** Nikolaus Heveker, Centre de Recherche, #6737 CHU Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada.

Number of text pages : 33

Number of tables : 2

Number of figures : 6

Number of references : 40

Number of words in Abstract : 249

Number of words in Introduction : 678

Number of words in Discussion : 1401

**Non-standard abbreviations:** AC (adenylate cyclase); BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer); GFP (Green Fluorescent Protein); GPCRs (G protein-coupled receptors); HEK (Human Embryonic Kidney); PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>); PTX (Pertussis toxin); Rluc (*Renilla* luciferase); YFP (Yellow Fluorescent Protein).

Recommended section assignment: Cellular and Molecular

## **Abstract**

Classically, the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> has been classified as coupling to the Gα<sub>s</sub> subunit, leading to intracellular cAMP increases. However EP<sub>4</sub> signaling has been revealed to be more complex and also involves coupling to PTX-sensitive Gα<sub>i</sub> proteins and β-arrestin mediated effects. There are now many examples of selective activation of independent pathways by G-protein coupled receptor (GPCR) ligands, a concept referred to as functional selectivity. Since most EP<sub>4</sub> ligands had thus far only been functionally characterized by their ability to stimulate cAMP production, we systematically determined the potencies and efficacies of a panel of EP<sub>4</sub> ligands for activation of Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i</sub> and β-arrestin relative to the endogenous ligand PGE<sub>2</sub>. For this purpose, we adapted three bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays to evaluate the respective pathways in living cells. Our results suggest considerable functional selectivity among the tested, structurally related agonists. PGE<sub>2</sub> was the most selective in activating Gα<sub>s</sub>, whereas PGF<sub>2α</sub> and PGE<sub>1</sub> alcohol were the most biased for activating Gα<sub>i1</sub> and β-arrestin, respectively. We observed reversal in order of potencies between β-arrestin 2 and Gα<sub>i1</sub> functional assays when comparing PGE<sub>1</sub> alcohol and either PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> or M&B28767. Most ligands were full agonists for the three pathways tested. Our results have implications for the use of PGE<sub>2</sub> analogues in experimental and possibly clinical settings, as their activity spectra on EP<sub>4</sub> differ from that of the native agonist. The BRET-based methodology used for this first systematic assessment of a set of EP<sub>4</sub> agonists should be applicable for the study of other GPCRs.

## **Introduction**

Prostanoids (prostaglandins and thromboxane) are lipid hormone mediators derived from cyclooxygenase-catalyzed metabolism of arachidonic acid. Among prostanoids, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is the most widely produced in the body. Its various effects include the contraction or relaxation of smooth muscle, modulation of immune responses, and the regulation of the production of a variety of cytokines. PGE<sub>2</sub> is also implicated in several pathologies including cancer, inflammation and hypertension. Four G protein-coupled receptors (GPCRs) designated subtypes EP<sub>1-2-3-4</sub>, which activate different G protein-dependent signaling pathways but are often expressed in the same cell types, mediate the effects of PGE<sub>2</sub>. The biology of responses to PGE<sub>2</sub> is correspondingly complex, with however increasing evidence that EP<sub>4</sub> is a critical determinant for the role of PGE<sub>2</sub> in carcinogenesis and cancer progression (Fulton et al., 2006).

Accordingly, studies using mice lacking the EP<sub>4</sub> receptor (EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup>) and EP<sub>4</sub>-selective ligands have revealed a role of this receptor in progression of colon carcinogenesis, in addition to closure of the ductus arteriosus at birth, bone formation, protection against inflammatory bowel disease and progression of rheumatoid arthritis (Regan, 2003; Sugimoto and Narumiya, 2007). These studies suggest that EP<sub>4</sub> agonism or antagonism could find clinical applications such as in the treatment of cancers. The EP<sub>4</sub> receptor was initially shown to couple to Gα<sub>s</sub>, leading to stimulation of adenylate cyclase and increases in intracellular cAMP concentrations (Coleman et al., 1994a). More recently, it was demonstrated that EP<sub>4</sub> could also couple to a PTX-sensitive inhibitory G protein (Gα<sub>i/o</sub> family), resulting in activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Fujino and Regan, 2006). EP<sub>4</sub>-mediated PI3K signaling then leads to extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent induction of functional expression of early growth response factor-1 (EGR-1), which may play a role in cancer, as well as phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) and inhibition of protein kinase A (PKA) activity (Fujino et al., 2003; Fujino et al., 2005). Moreover, activation of EP<sub>4</sub> by PGE<sub>2</sub> leads to rapid desensitization (Nishigaki et al., 1996), as well as recruitment of β-arrestins 1 and 2

and internalization of the receptor (Desai and Ashby, 2001). Accumulating evidence indicates that  $\beta$ -arrestins can also serve as scaffolds to activate signaling cascades independently of G protein coupling for many GPCRs (DeWire et al., 2007). This was shown to be the case for EP<sub>4</sub> in colorectal cancer cells, where  $\beta$ -arrestin 1-dependent c-Src activation, and not G-protein activation, is responsible for PGE<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub>-mediated increased cellular migration and metastasis (Buchanan et al., 2006). Therefore, specific subsets of EP<sub>4</sub> signaling are involved in the clinically relevant effects of PGE<sub>2</sub>.

Growing evidence suggests that GPCRs can exist in multiple active conformations (Kenakin, 2003). Different ligands can stabilize distinct active receptor conformations that are only permissive to a subset of the receptor's complete repertoire of behaviors, or activate distinct pathways with different potency and intrinsic activity (efficacy). Thus, individual agonists lead to differential and independent coupling of the receptor to different G proteins or intracellular effectors, a concept referred to as functional selectivity (Galandrin et al., 2007; Urban et al., 2007a). To date, prostanoid receptor ligands are mainly characterized by their relative binding affinity to the different receptor subtypes as determined by radioligand competition binding assays (Abramovitz et al., 2000; Davis and Sharif, 2000). The evaluation of the functional pharmacology of EP<sub>4</sub> receptor ligands is often limited to their ability to induce cAMP production (Wilson et al., 2004), since the development of these drugs occurred before other EP<sub>4</sub> signaling pathways were characterized. Information about activation of other EP<sub>4</sub> pathways by these compounds is still lacking, and systematic investigation of the effect of these ligands on other EP<sub>4</sub> signaling pathways is therefore warranted. Knowledge about biased agonism of these ligands will be relevant for their use as pharmacological tools, with potential clinical relevance (Buchanan et al., 2006).

In this study, we use three different BRET assays for functional pharmacological characterization of various EP<sub>4</sub> receptor ligands in living HEK293 cells by evaluating the relative potency and intrinsic activity of these ligands on three distinct signaling pathways relevant for EP<sub>4</sub> biology, namely the activation of  $G\alpha_i$  and  $G\alpha_s$  subunits, as well as the recruitment of  $\beta$ -arrestin.



## **Methods**

*Reagents* – M&B28767 (7-[(1R,2R)-2-[(E,3R)-3-hydroxy-4-(phenoxy)but-1-enyl]-5-oxocyclopentyl]heptanoic acid) was a gift from Sanofi-Aventis, Dagenham Essex, UK; L-902688 (5R-[(1E)-4,4-difluoro-3R-hydroxy-4-phenylbut-1-en-1-yl]-1-[6-(1H-tertrazol-5-yl)hexyl]pyrrolidin-2-one) was a gift from Merk Frosst (Pointe-Claire, QC, Canada); all other EP<sub>4</sub> ligands were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

*Cell culture and transfections* – Human embryonic kidney (HEK) 293E cells (passage number ≈10-30; Invitrogen) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 units/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and 200 µg/ml G418. Transient transfections were performed in 6-well or 10 cm dishes using the polyethylenimine (Polysciences, PA) method (Boussif et al., 1995).

*Plasmids* – The expression vectors containing human EP<sub>4</sub> receptor and Gγ<sub>2</sub> were obtained from the Missouri S&T cDNA Resource Center ([www.cdna.org](http://www.cdna.org)). EP<sub>4</sub>-YFP was constructed by ligating the PCR-amplified coding sequence of EP<sub>4</sub> (lacking its stop codon) into the pGFP-N1-Topaze backbone of CXCR4-YFP (Issafras et al., 2002) at *Hind*III/*Age*I sites. The mutations A55T, C124A and M185V were inserted in Rluc to generate Rluc3, a variation of the Rluc8 mutant described by Loening et al. (2006). The GFP10-Epac-Rluc3 BRET<sup>2</sup>-cAMP biosensor was constructed in 3 steps. First, the green fluorescent protein variant GFP10 (Hamdan et al., 2006), the linker GSAGT-(Acc65I/*Hind*III)-KLPAT and Rluc3 were inserted in pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen). Part of the human Epac1 (residues 144-881) was then amplified by PCR, digested by Acc65I-*Hind*III and inserted using the same restriction sites between GFP10-GSAGT and KLPAT-Rluc3 in pCDNA3.1/Zeo. Finally, the substitutions T781A and F782A were introduced by PCR to remove the Rap1 binding site of Epac1. YFP-Gβ<sub>1</sub> expression vector was obtained from GFP10-Gβ<sub>1</sub> (Galés et al., 2005) by replacing GFP10 with the coding sequence of eYFP (pIRES-eYFP,

Clontech). Plasmids encoding  $G\alpha_{i1}$ -91Rluc and Rluc- $\beta$ -arrestin 2 have been described previously (Perroy et al., 2003; Galés et al., 2006). All generated constructs were confirmed by sequencing.

*BRET measurement* – Transiently transfected HEK293 cells were seeded in 96-well white clear bottom microplates (ViewPlate, PerkinElmer) coated with poly-D-lysine and left in culture for 24h. Cells were washed once with PBS and the Rluc substrates coelenterazine h (for BRET<sup>1</sup> experiments; NanoLight Technology) or coelenterazine 400A (for BRET<sup>2</sup> experiments; Biotium) added at a final concentration of 5 $\mu$ M to BRET buffer (PBS, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% glucose). BRET readings were collected using a Mithras LB940 plate reader (Berthold) and MicroWin2000 software. BRET<sup>1</sup> measurement between Rluc and YFP was obtained by sequential integration of the signals detected in the 460-500 nm (luciferase) and 510-550 nm (YFP) windows, whereas BRET<sup>2</sup> readings between Rluc3 and GFP10 were collected by sequential integration of the signals detected in the 365-435 nm (Rluc3) and 505-525 nm (GFP10) windows. The BRET signal was calculated as the ratio of light emitted by acceptor (YFP or GFP10) over the light emitted by donor (Rluc or Rluc3). The values were corrected to net BRET by subtracting the background BRET signal obtained in cells transfected with Rluc (BRET<sup>1</sup>) or Rluc3 (BRET<sup>2</sup>) constructs alone. Ligands were incubated at room temperature for 3 ( $G\alpha_{i1}$ ), 10 (Epac) or 25 ( $\beta$ -arrestin) min, except for kinetics studies. For experiments with GW627368X or PTX, cells were treated for 10 min at room temperature or 16 hours at 37°C, respectively, with the inhibitor prior to agonist exposure. For kinetic analysis, ligands were injected using the Mithras LB940 injector 10 min after coelenterazine addition and BRET readings collected at 1 ( $G\alpha_{i1}$ ), 17 (Epac) or 50 s ( $\beta$ -arrestin) intervals.

*Radioligand saturation binding* – Transiently transfected HEK293 cells were incubated for 90 min at 4°C in PBS/0.5% BSA (w/v) buffer with different concentrations of [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>, in the presence or absence of 1000-fold excess unlabelled PGE<sub>2</sub> to determine specific binding. Cells were washed three times with

PBS/0.5% BSA and lysed with 0.1 N NaOH/0.1% Triton X-100. Bound radioactivity was measured on cell lysates with a liquid scintillation counter.

*Data analysis* – Data from BRET assays were the mean of independent experiments each performed in triplicate. Curve-fitting and statistical analysis was conducted by using GraphPad Prism 4 software. Statistical significance of the differences between more than two groups was calculated using one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test.

## **Results**

*BRET assay allows monitoring of EP<sub>4</sub>-dependent Gα<sub>s</sub> activation.* Intracellular cAMP accumulation following stimulation of adenylate cyclase (AC) is the best characterized EP<sub>4</sub> signaling pathway. To monitor this Gα<sub>s</sub>-dependent pathway in living cells, we generated a BRET<sup>2</sup> version of the previously described CAMYEL Epac-based BRET sensor (Jiang et al., 2007). The inactive cytosolic mutant form of human Epac1 was inserted between GFP10 and Rluc3, a mutant form of *Renilla reniformis* luciferase with increased stability and light output. Binding of cAMP to GFP10-Epac-Rluc3 induces a conformational change in Epac that results in a decrease of the BRET<sup>2</sup> signal between the Rluc3 donor and GFP10 acceptor. Stimulation of HEK293 cells co-expressing this Epac biosensor and human EP<sub>4</sub> receptor with PGE<sub>2</sub> lead to a strong concentration-dependent cAMP response (Fig. 1A) with an average EC<sub>50</sub> of 0.3 nM (Table 1). Addition of forskolin (100 μM) to maximally stimulate AC lead to a BRET<sup>2</sup> variation greater than that obtained with PGE<sub>2</sub>, indicating that the maximal PGE<sub>2</sub> response is within the dynamic range of the Epac sensor. Stimulation of Epac/EP<sub>4</sub>-transfected cells with the cell-permeable cAMP analog 8-bromo-cAMP also lead to a sigmoidal concentration-response BRET<sup>2</sup> variation (Fig. 1B); stimulation of cells with a saturating (1 μM) dose of PGE<sub>2</sub> indicated that the maximal PGE<sub>2</sub>-induced response was within the linear range of the Epac sensor response. The cAMP levels induced by PGE<sub>2</sub> stimulation rose rapidly and peaked after ~5-10 minutes, after which they slowly decreased due to the action of phosphodiesterases and the desensitization of the receptor and cAMP production system (Fig. 1C). To make certain that the measured BRET<sup>2</sup> signal was specific to EP<sub>4</sub> receptor activation, we pre-treated cells with the EP<sub>4</sub>-specific antagonist GW627368X; this resulted in abrogation of the PGE<sub>2</sub>-mediated cAMP level increase (Fig. 1D). A similar effect was observed when cells were transfected with Epac sensor in the absence of the EP<sub>4</sub> receptor (Fig. 1D). To further ensure that other endogenously expressed prostanoid receptors were not activating the Epac sensor, we also treated cells that were transfected with the sensor, but not EP<sub>4</sub>, with 1 μM of either PGD<sub>2</sub> (the natural DP receptor ligand), PGF<sub>2α</sub> (the natural FP receptor ligand),

carbaprostacyclin (a stable analog of PGI<sub>2</sub> and agonist of IP receptor) or U-46619 (a TP receptor agonist). Average BRET variations of less than 3% of the basal signal were detected in all cases, as opposed to variations of 21.5% induced by PGE<sub>2</sub> in cells co-transfected with EP<sub>4</sub> (results not shown).

*BRET assay to monitor activated EP<sub>4</sub>-mediated Gα<sub>i1</sub>β<sub>1</sub> rearrangement.* In addition to coupling to Gα<sub>s</sub>, EP<sub>4</sub> can also couple to the PTX-sensitive Gα<sub>i/o</sub> family of G proteins, and we detected an increase in cAMP response by EP<sub>4</sub> following treatment with PTX (Fig. 1D), as previously reported (Fujino and Regan, 2006). However, since this Gα<sub>i/o</sub>-dependent inhibition of AC is masked by the Gα<sub>s</sub> coupling to EP<sub>4</sub>, we used a recently developed BRET assay that allows monitoring of receptor activation-dependant structural rearrangements within the heterotrimeric Gα<sub>i1</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> complex in live cells (Galés et al., 2006). Specifically, the Rluc donor was inserted within the loop connecting helices A and B of the Gα<sub>i</sub> helical domain, and the YFP acceptor was fused to the N-terminus of Gβ<sub>1</sub>. Under basal conditions, a strong BRET signal between Gα<sub>i1</sub>-Rluc and YFP-Gβ<sub>1</sub> was measured (Fig. 2A), indicative of pre-association of Gα<sub>i1</sub> and Gβ<sub>1</sub>. Kinetic analysis of the BRET signal upon stimulation of EP<sub>4</sub> by PGE<sub>2</sub>, but not vehicle alone (Fig. 2A, inset), revealed a very rapid decrease in the BRET signal (within 1s); this decrease was sustained for at least 3 minutes. This signal was dose-dependent, with an average EC<sub>50</sub> of 4.08 nM (Table 1 and Fig. 2B). No response was detected in cells pre-treated with PTX or the EP<sub>4</sub> antagonist GW627368X, or in cells in which empty vector was co-transfected in place of EP<sub>4</sub> (Fig. 2C), demonstrating that the measured BRET variation specifically reflected EP<sub>4</sub> receptor-mediated activation of Gα<sub>i1</sub>. To ascertain that other endogenously expressed prostanoid receptors were not implicated in Gα<sub>i1</sub> activation, we also treated cells in which empty vector was co-transfected in place of EP<sub>4</sub> with 1 μM of PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, carbaprostacyclin or U-46619. An average BRET variation of less than 2% of the basal level was detected after stimulation with either of these ligands (results not shown), as opposed to 41% variation induced by PGE<sub>2</sub> when EP<sub>4</sub> was co-transfected (Fig. 2C). The ligand-induced BRET variation most likely reflects G protein activation based on the following observations: 1) it is completely abrogated by PTX,

2) it is conserved for a large panel of  $G\alpha_i$ -coupled GPCRs (Galés et al., 2006), 3) BRET variations correspond to the signaling efficacy of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor ligands (Galés et al., 2006) and 4) the potencies of the  $\delta$ -opioid receptor agonist D-pen-2,5-enkephalin to induce BRET variation and to promote [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding in cells transfected with  $\delta$ -opioid receptors were very similar (Audet et al., 2008).

*BRET assay to monitor recruitment of  $\beta$ -arrestin to activated  $EP_4$  receptor.* A third  $EP_4$  receptor signaling pathway, relevant to cancer, is the recruitment of  $\beta$ -arrestin to  $EP_4$ . This was measured by following the ligand-induced BRET signal between Rluc- $\beta$ -arrestin 2 and  $EP_4$ -YFP receptors in live HEK293 cells. BRET-based measurement of  $\beta$ -arrestin recruitment to monitor receptor activation has been used for a multitude of GPCRs, and has also been used as a high throughput screening method for the identification of ligands (Hamdan et al., 2005). Fusion of YFP at the C-terminus of  $EP_4$  had no effect on binding affinity of [ $^3$ H]PGE $_2$  for the receptor ( $K_d = 5.5 \pm 3.1$  nM for  $EP_4$ -YFP and  $5.0 \pm 1.9$  nM for  $EP_4$ ). BRET kinetics showed a rapid PGE $_2$ -induced recruitment of  $\beta$ -arrestin 2 to  $EP_4$  (Fig. 3A) that lead to a prolonged interaction (over 30 min), representative of a class B receptor- $\beta$ -arrestin interaction (Oakley et al., 2000). Exposure of cells to PGE $_2$  resulted in a significant concentration-dependent increase in the BRET signal detected over basal level (Fig. 3B), with an average EC $_{50}$  of 2.01 nM (Table 1). PGE $_2$ -induced recruitment of Rluc- $\beta$ -arrestin 1 to  $EP_4$ -YFP showed similar kinetics and potency as for  $\beta$ -arrestin 2 (data not shown). Pre-treatment of cells with PTX had no effect on the PGE $_2$ -induced recruitment of  $\beta$ -arrestin 1 or 2 to  $EP_4$  (results not shown), suggesting that this process was not  $G\alpha_{i/o}$ -dependent.

*Potency of  $EP_4$  ligands for  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i1}$  and  $\beta$ -arrestin 2 signaling pathways.* Using the BRET assays described above, we compared the potencies of various  $EP_4$  ligands to induce  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i1}$  and  $\beta$ -arrestin 2 responses. The chemical structure and previously reported binding affinity (in competition assays with [ $^3$ H]PGE $_2$  to recombinant  $EP_4$  receptors) of these ligands are shown in Table 2. In principle, it is problematic to interpret differences in ligand potencies between different assays systems, assessing

different functional readouts. While different potencies might indeed reflect agonist bias, they might also be due to different coupling efficacies of the target receptor to the respective effectors, or simply to differences in parameters that determine the sensitivity of a given assay. However, the relative comparison of EC<sub>50</sub>s obtained for a set of ligands with respect to a reference ligand permits to draw conclusions on their respective set of relative potencies. Moreover, the reconstituted systems used in this study are similar with respect to the expressed quantities of the transfected receptor,  $\beta$ -arrestin, and  $G\alpha_{i1}$  (Supplementary Figs. 1 and 2, Supplementary Table 1). Therefore, as a prospective limitation, our study does not address physiological or pathophysiological conditions of primary cells, which may be different from our model system due to availability of the respective signaling molecules.

Overall, the observed potency of all ligands for cAMP generation was greater than for  $\beta$ -arrestin recruitment, except for PGE<sub>1</sub> alcohol, for which no significant difference of pEC<sub>50</sub> values was observed between these two assays (Table 1, Fig. 4A). Similarly, potency of ligands in the  $G\alpha_{i1}$  assay was equal or greater compared to their potency in  $\beta$ -arrestin recruitment, again with the exception of PGE<sub>1</sub> alcohol, which was significantly more potent for recruitment of  $\beta$ -arrestin 2 than for  $G\alpha_{i1}\beta_1$  rearrangement. Overall, the potencies that we obtained for cAMP production were slightly lower (approximately half a log) than those previously reported in the study of Wilson and colleagues (2004), possibly due to variations in receptor density. However, relative potencies (compared to PGE<sub>2</sub>) of all agonists tested by us match those reported by Wilson et al. (2004).

Comparing the rank orders of the set of EP<sub>4</sub> agonists, we found that the rank orders of potency for  $G\alpha_{i1}$  and  $G\alpha_s$  activation were similar: L-902688  $\geq$  PGE<sub>1</sub>  $\geq$  PGE<sub>2</sub> = 11-deoxy PGE<sub>1</sub>  $\gg$  16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> = Misoprostol = 17-phenyl-trinor PGE<sub>2</sub> = M&B28767  $\gg$  PGE<sub>1</sub> alcohol = PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  = PGD<sub>2</sub>. The rank order for the recruitment of  $\beta$ -arrestin 2 differed slightly: L-902688  $\geq$  PGE<sub>1</sub> = PGE<sub>2</sub> = 11-deoxy PGE<sub>1</sub>  $\gg$  16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>  $\geq$  Misoprostol = 17-phenyl-trinor PGE<sub>2</sub> = M&B28767  $>$  PGE<sub>1</sub> alcohol  $\gg$  PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  = PGD<sub>2</sub>. Thus, unlike for the G-protein rank orders of potency, PGE<sub>1</sub> was not superior to PGE<sub>2</sub>/11-deoxy PGE<sub>1</sub> ( $G\alpha_{i1}$ ) or inferior to L-902688 ( $G\alpha_s$ ), misoprostol was inferior to 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> but was not superior to PGE<sub>1</sub>

alcohol and PGE<sub>1</sub> alcohol was clearly more potent than PGF<sub>2α</sub>/PGD<sub>2</sub> (Table 1). We observed a reversal in the rank order of potencies between β-arrestin 2 and Gα<sub>i1</sub> functional assays when comparing PGE<sub>1</sub> alcohol and either PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> or M&B28767 (Fig. 4A, Table 1). Other agonists showed important differences of relative potency between signaling pathways without however showing reversal of relative potencies. For example, pEC<sub>50</sub> values for cAMP production and Gα<sub>i1</sub> activation were not significantly different for 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> but differed by over a log for PGE<sub>2</sub> (Fig. 4A); similarly, pEC<sub>50</sub> values for cAMP production and β-arrestin recruitment were nearly identical for PGE<sub>1</sub> alcohol, but differed by over a log for L-902688, M&B28767, Misoprostol and PGF<sub>2α</sub> (Figs. 4A and 4B, Table 1).

When comparing relative potency ratios, a bias for Gα<sub>i1</sub> over Gα<sub>s</sub> signaling could be observed for all ligands compared to PGE<sub>2</sub>, with 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> being the most Gα<sub>i1</sub>-biased ligand (Fig. 5A). Six out of the ten ligands had a relative bias towards β-arrestin recruitment over Gα<sub>s</sub> compared to PGE<sub>2</sub>, with PGE<sub>1</sub> alcohol as the most β-arrestin-biased agonist (Fig. 5B). PGE<sub>1</sub> alcohol was also the only ligand that had an arrestin over Gα<sub>i1</sub> bias (Fig. 5C).

#### *Intrinsic activity of EP<sub>4</sub> ligands for Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i1</sub> and β-arrestin 2 signaling pathways.*

We then compared the relative intrinsic activities of the different ligands in Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i1</sub> and β-arrestin 2 signaling pathways (Table 1), using PGE<sub>2</sub> as a reference “full agonist” set at 100%. Most ligands proved to be full agonists for the three pathways tested. One exception was PGD<sub>2</sub>, which was a partial agonist for recruitment of β-arrestin 2 (intrinsic activity of 77.9 ± 4.4%; Table 1, Fig. 6), but a full agonist for activation of Gα<sub>s</sub> and Gα<sub>i1</sub> pathways (93.2 ± 4.2% and 96.1 ± 1.6%, respectively). Inversely, L-902688 had (slightly) lower intrinsic activity in cAMP production and the Gα<sub>i1</sub> pathway (94.4 ± 2.6% and 89.9 ± 2%, respectively), while being full agonist for β-arrestin (102.6 ± 1.1%).



## **Discussion**

During the past years, it became increasingly clear that G-protein coupled receptors can activate independently a variety of signaling effectors, and that distinct receptor ligands can do so with different potencies and efficacies (intrinsic activities). This selective activation of independent pathways by ligands has been termed functional selectivity (Urban et al., 2007a). The conceptual basis for this is that GPCRs do not have merely “inactive” and “active” conformations, but that ligands can stabilize distinct receptor conformations, which are more or less potent and efficient in activating a given readout (Kenakin, 2003; Kenakin, 2007b). The significance of functional selectivity obviously raises the question whether previously reported properties of synthetic or natural ligands were based on the “right” (that is, clinically relevant) readout, especially for compounds that have therapeutic use. Moreover, for most clinical contexts the relevant signaling pathway of any given receptor remains often as yet elusive (Bosier and Hermans, 2007). Experiments using synthetic ligands with known functional selectivity profiles in animal models will be required to pin down the clinically relevant receptor signaling pathways, and might also identify drug candidates or leads for further development. However, functional selectivity profiles of drugs and synthetic ligands are only beginning to be identified (Galandrin and Bouvier, 2006; Audet et al., 2008; Gao and Jacobson, 2008; Masri et al., 2008). Reassessment of ligand-induced signaling activity of known GPCR ligands is therefore warranted, taking functional selectivity into account.

Classically, the prostaglandin receptor EP<sub>4</sub> had been classified as coupling to the G $\alpha_s$  subunit as an effector. However, in recent years, EP<sub>4</sub> signaling has revealed more complex and was shown to also involve coupling to PTX-sensitive G $\alpha_i$  proteins as well as  $\beta$ -arrestin mediated effects. Importantly,  $\beta$ -arrestin recruitment to EP<sub>4</sub> rather than G $\alpha_s$ -mediated signaling has been associated with colorectal cancer progression (Buchanan et al., 2006). Additionally, the G $\alpha_i$  pathway could also be implicated in the cAMP/PKA-independant role of EP<sub>4</sub>-mediated increased phosphorylation of PI3K and ERK1/2 and EGR-1 induction in colon cancer (Pozzi et al., 2004; Cherukuri et al., 2007). Our study set out to systematically characterize the

response of a wide range of EP<sub>4</sub> agonists for the downstream effectors Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i1</sub>, and β-arrestin, thereby addressing functional selectivity.

By adapting three different BRET-based assays, we monitored receptor signaling in real time in live cells. β-arrestin recruitment was assessed by direct interaction between tagged EP<sub>4</sub> and β-arrestin 2 proteins. Activation of Gα<sub>s</sub> and Gα<sub>i</sub> pathways was determined by measuring BRET signal variations resulting from structural rearrangements within Epac and heterotrimeric Gα<sub>i1</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> proteins, respectively. These energy transfer variations were practically absent in cells treated with the EP<sub>4</sub>-specific antagonist GW627368X or in cells that were not transfected with EP<sub>4</sub>, indicating that BRET modulations were indeed specific to EP<sub>4</sub> receptor and did not result from the activation of endogenously expressed prostanoid receptors.

Our results suggest considerable functional selectivity among the tested, structurally related agonists. Interestingly, all compounds showed a relative bias towards Gα<sub>i1</sub> over Gα<sub>s</sub> activation when compared to PGE<sub>2</sub>, this effect being the strongest with 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>, which activated both alpha subunits with almost equal potency (while PGE<sub>2</sub> activates Gα<sub>s</sub> with tenfold potency over Gα<sub>i1</sub>) (Figures 4A, 5A, and Table 1). Similarly, the profiles of six (PGE<sub>1</sub> alcohol, 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGD<sub>2</sub>, 17-phenyl-trinor PGE<sub>2</sub> and 11-deoxy PGE<sub>1</sub>) out of the ten analogs show relatively more potent activation of β-arrestin recruitment than Gα<sub>s</sub> responses relative to PGE<sub>2</sub>. When comparing the relative potency of a ligand to induce each of the three measured signaling pathways, PGE<sub>2</sub> was the most selective in activating Gα<sub>s</sub>, whereas PGF<sub>2α</sub> and PGE<sub>1</sub> alcohol were the most selective for activating Gα<sub>i1</sub> and β-arrestin, respectively (Fig. 5). When all tested pathways were considered, the profiles of PGE<sub>1</sub> alcohol and 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> were most distinct from PGE<sub>2</sub> (Fig. 4B). PGE<sub>1</sub> alcohol activated both Gα<sub>i1</sub> and β-arrestin relatively more potently than Gα<sub>s</sub>, as compared to PGE<sub>2</sub>, whereas 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> was a relatively weak activator of β-arrestin recruitment, but a relatively better activator of Gα<sub>i1</sub> than PGE<sub>2</sub> (Fig. 5). The order of potency for PGE<sub>1</sub> alcohol and PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> or M&B28767 was reversed for β-arrestin recruitment and Gα<sub>i1</sub> activation: PGE<sub>1</sub> alcohol was more potent for the β-arrestin pathway than for the Gα<sub>i1</sub> pathway, while the opposite was true for PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> and M&B28767 (Fig. 4A, Table 1). This reversal

of potency ratio for these signaling pathways is incompatible with a single receptor active state, but in line with the existence of ligand-specific receptor states that result in differential activation of signaling pathways, as suggested by the concept of functional selectivity (Urban et al., 2007a).

We observed that most agonists tested had full intrinsic activity in all pathways, as reported earlier for cAMP production (Wilson et al., 2004). An exception was L-902688 that had slightly but significantly reduced efficacy in activation of both tested G-proteins. PGD<sub>2</sub> was also less efficacious in  $\beta$ -arrestin recruitment as detected by BRET. It is important to consider that maximal responses from BRET assays may relate to either more interacting molecules or to closer donor-acceptor distances. In this case, lower intrinsic activity for  $\beta$ -arrestin/EP<sub>4</sub> BRET induced by PGD<sub>2</sub> as compared to the reference ligand PGE<sub>2</sub> thus suggests that either less arrestin molecules are recruited to the receptor-fused energy acceptor, or that the energy transfer is less efficient in the receptor/arrestin complex induced by PGD<sub>2</sub> due to distinct conformational changes. Indeed, recently reported results obtained with the angiotensin receptor AT1aR, the  $\beta$ 2-adrenergic receptor, and the parathyroid hormone receptor type 1 (PTH1R), revealed different arrestin conformations depending on the ligand that was applied (Shukla et al., 2008). Accordingly, it might be expected that such different arrestin conformations also translate in different BRET signals resulting from the receptor-arrestin interaction. We interpret the lower efficacy of L-902688 in the  $G\alpha_{i1}/G\beta_1$  BRET as a distinct conformational rearrangement in the  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  heterotrimer. Indeed, the PGE<sub>2</sub>-induced BRET decrease between  $G\alpha_{i1}$ -Rluc and YFP- $\beta_1$  could reflect dissociation of  $\alpha_{i1}$  from the  $\beta_1\gamma_2$  dimer, but overall results obtained by Galés et al. (2006) strongly suggest that this BRET variation rather corresponds to  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  structural rearrangements within a stable heterotrimer that results in G-protein activation. This is, however, not true for the cAMP Epac BRET sensor, where signal intensity only relates to cAMP levels, and not to different conformations of the sensor.

The paucity of differences in intrinsic activity between ligands is in line with previous reports on these ligand's efficacies in cAMP production (Wilson et al., 2004), but somewhat surprising when considering results obtained in other receptor

systems. Indeed, large differences in  $\beta$ -arrestin recruitment efficacy (also measured by BRET) were observed in studies with synthetic agonists of the dopamine D2 receptor (Klewe et al., 2008) or natural peptide agonists of the glucagon-like peptide receptor (Jorgensen et al., 2007). We speculate that the relative stability in intrinsic efficacy that we observed might be linked to the structural similarity of the here employed ligands (Table 2). In principle, differences in intrinsic ligand activity might also be masked by receptor overexpression, leading to increased receptor reserve and underestimation of the maximal response. This clearly is not the case for the Epac-based cAMP assay where the maximal response lies within the dynamic response range as shown with a saturating concentration of forskolin. In the intermolecular BRET systems between  $G\alpha_{i1}\beta_1$  or  $EP_4$ - $\beta$ -arrestin, in turn, maximal response cannot be evaluated, as they may depend on both quantitative and qualitative differences (see above).

The activation of the  $G\alpha_{i1}$  and  $\beta$ -arrestin recruitment pathways by  $EP_4$  has been reported much later than its responses in the classical  $G\alpha_s$  pathway. Accordingly, our study is the first to systematically report these pathways for a series of  $EP_4$  agonists. The finding that a substantial number of the tested ligands are relatively stronger activators of these non-canonical  $EP_4$  pathways than the natural ligand  $PGE_2$  must be taken into account when using these compounds as tools in experiments designed to further dissect the biological roles of  $EP_4$ , for example in cancer genesis and progression.

Taken together, our study is the first to systematically characterize the response of a set of  $EP_4$  agonists for the downstream effectors  $\beta$ -arrestin and  $G\alpha_{i1}$ , using BRET-based methodology that should be applicable for the study of other GPCRs. We find significant functional selectivity among the studied ligands. While more work will be required to examine the bearing of our observations in a more complex native context including the presence of other  $PGE_2$  receptors, our  $EP_4$ -limited study is the first step for assessing the consequences of functional selectivity in physiology and drug treatment.

### **Acknowledgments**

We thank Hendrika Fernandez for expert technical assistance.

### **Footnotes**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [Grant CTP-79848]. M.L. was supported by studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. S.C. and M.B. hold Canada Research Chairs in Perinatology and in Signal Transduction and Molecular Pharmacology, respectively. N.H. is a CIHR New Investigator.

Current affiliation (C.G.): Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U858-I2MR-Equipe 8, Toulouse, France.

## **References**

- Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carriere M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N and Metters KM (2000) The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* **1483**:285-293.
- Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M and Pineyro G (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **283**:15078-15088.
- Bosier B and Hermans E (2007) Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance. *Trends Pharmacol Sci* **28**:438-446.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7297-7301.
- Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM and DuBois RN (2006) Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1492-1497.
- Cherukuri DP, Chen XB, Goulet AC, Young RN, Han Y, Heimark RL, Regan JW, Meuillet E and Nelson MA (2007) The EP4 receptor antagonist, L-161,982, blocks prostaglandin E2-induced signal transduction and cell proliferation in HCA-7 colon cancer cells. *Exp Cell Res* **313**:2969-2979.
- Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A and Sheldrick RL (1994) A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* **47**:151-168.

- Davis TL and Sharif NA (2000) Pharmacological characterization of [(3)H]-prostaglandin E(2) binding to the cloned human EP(4) prostanoid receptor. *Br J Pharmacol* **130**:1919-1926.
- Desai S and Ashby B (2001) Agonist-induced internalization and mitogen-activated protein kinase activation of the human prostaglandin EP4 receptor. *FEBS Lett* **501**:156-160.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ and Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**:483-510.
- Fujino H and Regan JW (2006) EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein. *Mol Pharmacol* **69**:5-10.
- Fujino H, Salvi S and Regan JW (2005) Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Mol Pharmacol* **68**:251-259.
- Fujino H, Xu W and Regan JW (2003) Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **278**:12151-12156.
- Fulton AM, Ma X and Kundu N (2006) Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res* **66**:9794-9797.
- Galandrin S and Bouvier M (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* **70**:1575-1584.
- Galandrin S, Oligny-Longpre G and Bouvier M (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **28**:423-430.
- Galés C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**:177-184.
- Galés C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements

- in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**:778-786.
- Gao ZG and Jacobson KA (2008) Translocation of arrestin induced by human A(3) adenosine receptor ligands in an engineered cell line: comparison with G protein-dependent pathways. *Pharmacol Res* **57**:303-311.
- Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J and Bouvier M (2005) High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* **10**:463-475.
- Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B and Bouvier M (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**:Unit 5 23.
- Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M and Marullo S (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* **277**:34666-34673.
- Jiang LI, Collins J, Davis R, Lin KM, DeCamp D, Roach T, Hsueh R, Rebres RA, Ross EM, Taussig R, Fraser I and Sternweis PC (2007) Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem* **282**:10576-10584.
- Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, Schwartz TW and Elling CE (2007) Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through Galpha(s). *J Pharmacol Exp Ther* **322**:148-154.
- Kenakin T (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**:346-354.
- Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* **72**:1393-1401.
- Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y and Narumiya S (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the



- mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* **122**:217-224.
- Klewe IV, Nielsen SM, Tarpo L, Urizar E, Dipace C, Javitch JA, Gether U, Egebjerg J and Christensen KV (2008) Recruitment of beta-arrestin2 to the dopamine D2 receptor: insights into anti-psychotic and anti-parkinsonian drug receptor signaling. *Neuropharmacology* **54**:1215-1222.
- Loening AM, Fenn TD, Wu AM and Gambhir SS (2006) Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**:391-400.
- Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR and Caron MG (2008) Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:13656-13661.
- Nishigaki N, Negishi M and Ichikawa A (1996) Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* **50**:1031-1037.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG and Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**:17201-17210.
- Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S and Bouvier M (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *Embo J* **22**:3816-3824.
- Pozzi A, Yan X, Macias-Perez I, Wei S, Hata AN, Breyer RM, Morrow JD and Capdevila JH (2004) Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* **279**:29797-29804.
- Regan JW (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* **74**:143-153.
- Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2008) Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:9988-9993.

- Sugimoto Y and Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* **282**:11613-11617.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M and Mailman RB (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:1-13.
- Wilson RJ, Rhodes SA, Wood RL, Shield VJ, Noel LS, Gray DW and Giles H (2004) Functional pharmacology of human prostanoid EP2 and EP4 receptors. *Eur J Pharmacol* **501**:49-58.
- Young RN, Billot X, Yongxin H, Slipetz DA, Chauret N, Belley M, Metters K, Mathieu M-C, Greig GM, Denis D and Girard M (2004) Discovery and synthesis of a potent, selective and orally bioavailable EP4 receptor agonist. *Heterocycles* **64**:437-446.

### **Legends for Figures**

**Figure 1.** Epac-based BRET biosensor monitors EP<sub>4</sub>-mediated G $\alpha_s$  activation in living cells. A) Cells co-expressing Epac sensor and EP<sub>4</sub> were exposed to increasing concentrations of PGE<sub>2</sub> (solid triangles) or forskolin (100  $\mu$ M; open circle) for 10 min at RT and cAMP levels were evaluated by the emission (Rluc3/GFP10) ratios. Data are expressed as 1/BRET<sup>2</sup> signal so that an increase in ordinate values correlates with an increase in cAMP levels. Data from one representative experiment are shown (n=9); B) cells co-expressing Epac sensor and EP<sub>4</sub> were treated with increasing concentrations of 8-bromo-cAMP (open squares) or PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M; solid triangle) for 10 min at RT and emission ratios (Rluc3/GFP10) measured. Data from one representative experiment are shown (n=2); C) kinetics of PGE<sub>2</sub> (solid triangles) or vehicle (open circles)-induced cAMP production in cells co-expressing EP<sub>4</sub> and Epac sensor. Data from one representative experiment are shown (n=4); D) specificity of PGE<sub>2</sub>-promoted BRET signal. Cells transfected with Epac sensor in the presence or absence of EP<sub>4</sub> receptor were pre-treated or not with pertussis toxin (PTX; 0.1 $\mu$ g/ml, 16 h, 37°C) or EP<sub>4</sub> antagonist GW627368X (10  $\mu$ M, 10 min, RT) before addition of 10 nM PGE<sub>2</sub>. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of four experiments, each performed in triplicate; \*\*\* indicates statistical difference compared to cells transfected with EP<sub>4</sub> and treated with PGE<sub>2</sub> alone (repeated measures ANOVA and Tukey's post-test,  $P < 0.001$ ).

**Figure 2.** BRET assay to monitor EP<sub>4</sub>-mediated G $\alpha_{i1}$  activation in living cells. BRET was measured in cells co-transfected with G $\alpha_{i1}$ -Rluc, YFP-G $\beta_1$ , G $\gamma_2$  and EP<sub>4</sub>. A) BRET kinetics between G $\alpha_{i1}$ -Rluc and YFP-G $\beta_1$  was measured before and after addition (arrows) of PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) or vehicle (inset). Data from one representative experiment are shown (n=3); B) cells were exposed to increasing concentrations of PGE<sub>2</sub> and BRET variation compared to basal condition was measured. Data from one representative experiment are shown (n=9); C) 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>-promoted BRET variation in the presence or absence of co-transfected EP<sub>4</sub> receptor, pre-treated or not with

pertussis toxin (PTX; 0.1 µg/ml, 16 h, 37°C) or EP<sub>4</sub> antagonist GW627368X (10 µM, 10 min, RT). Data represent the mean ± S.E.M. of four experiments, each performed in triplicate; \*\*\* indicates statistical difference compared to cells transfected with EP<sub>4</sub> and treated with PGE<sub>2</sub> alone (one-way ANOVA and Tukey's post-test,  $P < 0.001$ ).

**Figure 3.** BRET assay to monitor β-arrestin recruitment to EP<sub>4</sub> receptors in living cells. BRET was measured in cells co-expressing EP<sub>4</sub>-YFP and Rluc-β-arrestin 2. A) BRET kinetics between EP<sub>4</sub>-YFP and Rluc-β-arrestin 2 was measured after addition of PGE<sub>2</sub> (1 µM). Data from one representative experiment are shown (n=3); B) cells were exposed for 25 min at RT to increasing concentrations of PGE<sub>2</sub> and BRET measured. Data from one representative experiment are shown (n=11).

**Figure 4.** Comparison of the potency of EP<sub>4</sub> agonists to activate distinct functional pathways. Cells were exposed to increasing concentrations of agonist and BRET measured as described in methods to determine concentration-response effects on cAMP production, Gα<sub>i1</sub> activation and β-arrestin recruitment. A) The fitted curve pEC<sub>50</sub> values obtained for the three functional assays are illustrated for selected agonists. Note that the pEC<sub>50</sub> of PGE<sub>1</sub> alcohol for Gα<sub>i1</sub> pathway was significantly lower than for β-arrestin 2 recruitment, whereas the potency ratio is reversed for PGF<sub>2α</sub>, indicative of receptor-based functional selectivity. Data represent the mean ± S.E.M. of 5-11 experiments, each performed in triplicate; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ns,  $P > 0.05$  (one way ANOVA and Tukey's post-test). B) Relative potency of each agonist for the activation of Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i1</sub> or β-arrestin 2. The data are expressed as the log of the ratio between the EC<sub>50</sub> value (in nanomolars) of a ligand for Gα<sub>s</sub> activation and the EC<sub>50</sub> value of the same ligand for Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i1</sub> or β-arrestin 2 pathways. Ligands with decreased relative potency for a function will thus have a negative change compared to another function, while ligands with increased potency for a function will show a positive change compared to the other function. 17-PT PGE<sub>2</sub>: 17-phenyl-trinor PGE<sub>2</sub>; 16,16-dm PGE<sub>2</sub>: 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>.

**Figure 5.** Preferential activation of  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i1}$  or  $\beta$ -arrestin 2 pathways compared to  $PGE_2$ . Potencies of agonists relative to  $PGE_2$  (relative potency =  $EC_{50} PGE_2 / EC_{50}$  agonist) were compared for the three functional pathways. The data represent the relative potency (RP) ratio for each pair of assays: ( $RP_{\text{assay 1}} / RP_{\text{assay 1}} + RP_{\text{assay 2}}$ ) and vice versa. A greater bar area represents a smaller  $EC_{50}$  relative to  $PGE_2$  and thus a greater potency for a given signaling pathway. Arrows indicate ligand bias (relative to  $PGE_2$ ) for each signaling pathway examined: A)  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_{i1}$ ; B)  $G\alpha_s$  and  $\beta$ -arrestin 2; C)  $G\alpha_{i1}$  and  $\beta$ -arrestin 2. 17-PT  $PGE_2$ : 17-phenyl-trinor  $PGE_2$ ; 16,16-dm  $PGE_2$ : 16,16-dimethyl  $PGE_2$ .

**Figure 6.** Reversal of relative maximal response of agonists for  $G\alpha_s/G\alpha_{i1}$  and  $\beta$ -arrestin 2 pathways. Intrinsic activity (relative to  $PGE_2$  maximal response) of L-902688 was significantly greater for  $\beta$ -arrestin 2 recruitment than for  $G\alpha_{i1}$  ( $P<0.01$ ) or  $G\alpha_s$  ( $P<0.05$ ) functions, while intrinsic activity of  $PGD_2$  was lower for  $\beta$ -arrestin 2 than for  $G\alpha_s$  or  $G\alpha_{i1}$  ( $P<0.05$ ) pathways ( $n = 4-6$ , one way ANOVA and Tukey's post-test).

**Table 1. Agonist concentration-response fitted curve parameters of EP<sub>4</sub> receptor-mediated cAMP production, Gα<sub>i1</sub> activation and β-arrestin 2 recruitment.**

Values represent means ± S.E.M. of 4 to 11 independent experiments, each performed in triplicate. Agonist efficacies (E<sub>max</sub>) are expressed relative to that of a saturating concentration of PGE<sub>2</sub>.

Ligand	cAMP				Gα <sub>i1</sub>				β-arrestin 2			
	EC <sub>50</sub> (nM)	pEC <sub>50</sub> ± SEM	E <sub>max</sub> ± SEM (%)	n	EC <sub>50</sub> (nM)	pEC <sub>50</sub> ± SEM	E <sub>max</sub> ± SEM (%)	n	EC <sub>50</sub> (nM)	pEC <sub>50</sub> ± SEM	E <sub>max</sub> ± SEM (%)	n
PGE <sub>2</sub>	0.30	9.63 ± 0.12 <sup>a</sup>	100	9	4.08	8.49 ± 0.1 <sup>b</sup>	100	9	2.01	8.78 ± 0.09 <sup>b</sup>	100	11
L902688	0.05	10.30 ± 0.02 <sup>a</sup>	94.4 ± 2.6 <sup>†</sup>	4	0.45	9.45 ± 0.12 <sup>b</sup>	89.9 ± 2 <sup>†</sup>	7	0.51	9.29 ± 0.09 <sup>b</sup>	102.6 ± 1.1 <sup>‡</sup>	7
PGE <sub>1</sub>	0.31	9.68 ± 0.14 <sup>a</sup>	103.1 ± 7.2	9	0.85	9.14 ± 0.11 <sup>b</sup>	101.6 ± 1.4	6	1.18	8.97 ± 0.08 <sup>b</sup>	98.8 ± 4	7
11-deoxy PGE <sub>1</sub>	0.47	9.38 ± 0.11 <sup>a</sup>	99.6 ± 4.8	5	3.24	8.60 ± 0.12 <sup>b</sup>	100.3 ± 3.8	8	2.13	8.68 ± 0.05 <sup>b</sup>	96.1 ± 2.3	4
M&B28767	17.7	7.82 ± 0.11 <sup>a</sup>	91.7 ± 3.8	7	69.9	7.16 ± 0.01 <sup>b</sup>	101.1 ± 7.9	5	184	6.77 ± 0.07 <sup>c</sup>	86.8 ± 3.4	6

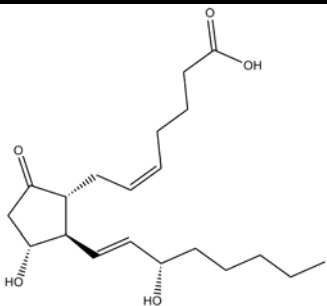
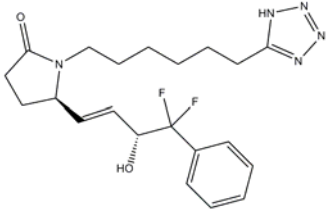
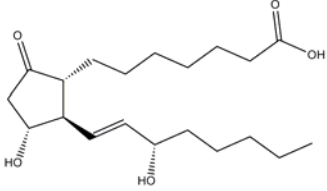
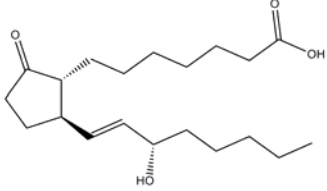
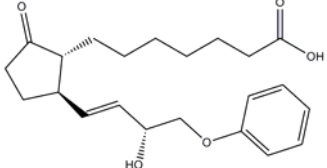
Misoprostol free acid	26.8	7.65 ± 0.12 <sup>a</sup>	105.3 ± 6.5	6	174	6.86 ± 0.13 <sup>b</sup>	112.1 ± 5.7	7	301	6.59 ± 0.1 <sup>b</sup>	101.4 ± 4.4	7
17-phenyl- trior PGE <sub>2</sub>	30.7	7.55 ± 0.1 <sup>a</sup>	93.0 ± 5.7	4	97.5	7.10 ± 0.1 <sup>b</sup>	104.7 ± 5.5	9	137	6.88 ± 0.04 <sup>b</sup>	92.9 ± 3.6	7
16,16- dimethyl PGE <sub>2</sub>	30.5	7.52 ± 0.03 <sup>a</sup>	99.2 ± 3.1	4	48.2	7.40 ± 0.12	102.8 ± 6.6	5	93.1	7.08 ± 0.11 <sup>b</sup>	98.2 ± 4.4	5
PGE <sub>1</sub> alcohol	575	6.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	84.4 ± 5.5	5	2281	5.73 ± 0.12 <sup>b</sup>	90.6 ± 5.8	7	691	6.20 ± 0.08 <sup>a</sup>	88.2 ± 1.9	7
PGF <sub>2α</sub>	910	6.14 ± 0.12 <sup>a</sup>	97.6 ± 2.5	6	2005	5.74 ± 0.09 <sup>a</sup>	94.5 ± 4.3	6	8405	5.13 ± 0.08 <sup>b</sup>	99.6 ± 2.8	7
PGD <sub>2</sub>	1664	5.84 ± 0.11 <sup>a</sup>	93.2 ± 4.2 <sup>†</sup>	5	2954	5.54 ± 0.04 <sup>a</sup>	96.1 ± 1.6 <sup>†</sup>	5	6740	5.20 ± 0.09 <sup>b</sup>	77.9 ± 4.4 <sup>‡*</sup>	4

<sup>a,b,c</sup> pEC<sub>50</sub> values in the same row designated with a different letter are significantly different,  $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test)

<sup>†,‡</sup> E<sub>max</sub> values in the same row designated with a different symbol are significantly different,  $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test)

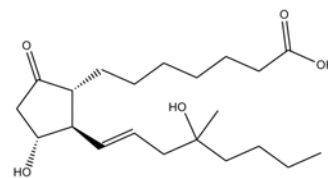
\* E<sub>max</sub> value is significantly different from PGE<sub>2</sub> reference,  $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Tukey's post-test)

**Table 2. Chemical structure and binding affinity of ligands competing with [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> for binding to recombinant EP<sub>4</sub> receptors.** *K<sub>i</sub>* values of all ligands represent binding affinity for human EP<sub>4</sub> receptors, with the exception of 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> and PGE<sub>1</sub> alcohol for which data for binding to murine EP<sub>4</sub> receptors are presented.

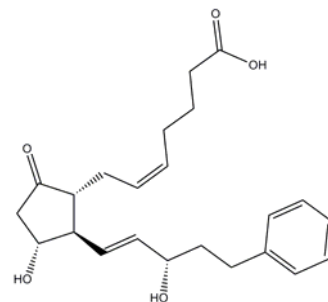
Ligand	<i>K<sub>i</sub></i> (nM)	Reference	Structure
PGE <sub>2</sub>	0.79 0.75	(Abramovitz et al., 2000) (Davis and Sharif, 2000)	 The chemical structure of PGE <sub>2</sub> is shown. It features a five-membered cyclopentane ring with a ketone group (=O) at position 2, a hydroxyl group (-OH) at position 3, and two double bonds at positions 6 and 9. A long side chain is attached at position 1, ending in a carboxylic acid group (-COOH).
L902688	0.38	(Young et al., 2004)	 The chemical structure of L902688 is shown. It consists of a five-membered ring with a carbonyl group (=O) and a nitrogen atom. The nitrogen is part of a side chain that includes a double bond, a hydroxyl group (-OH), and a fluorinated carbon atom. The side chain terminates in a 1,2,4-triazole ring.
PGE <sub>1</sub>	1.45	(Davis and Sharif, 2000)	 The chemical structure of PGE <sub>1</sub> is shown. It is similar to PGE <sub>2</sub> but lacks the double bond at position 9. It has a five-membered ring with a ketone group (=O) at position 2, a hydroxyl group (-OH) at position 3, and a double bond at position 6. The side chain ends in a carboxylic acid group (-COOH).
11-deoxy PGE <sub>1</sub>	1.36	(Davis and Sharif, 2000)	 The chemical structure of 11-deoxy PGE <sub>1</sub> is shown. It is similar to PGE <sub>1</sub> but lacks the hydroxyl group at position 11. It has a five-membered ring with a ketone group (=O) at position 2 and a double bond at position 6. The side chain ends in a carboxylic acid group (-COOH).
M&B28767	10	(Abramovitz et al., 2000)	 The chemical structure of M&B28767 is shown. It features a five-membered ring with a ketone group (=O) and a double bond. The side chain includes a hydroxyl group (-OH) and an ether linkage (-O-) connected to a benzene ring.



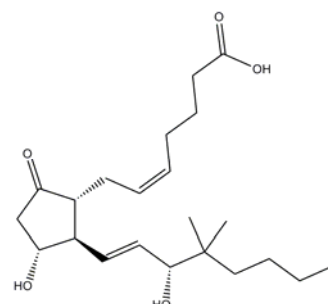
Misoprostol free acid 23 (Abramovitz et al., 2000)



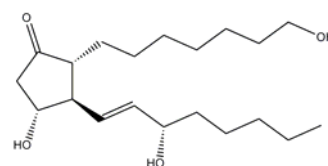
17-phenyl-trinor PGE<sub>2</sub> 34.5 (Davis and Sharif, 2000)



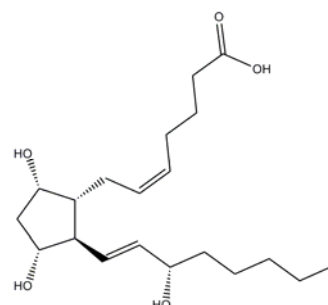
16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> 43 (Kiriyaama et al., 1997)



PGE<sub>1</sub> alcohol 190 (Kiriyaama et al., 1997)



PGF<sub>2α</sub> 288 (Abramovitz et al., 2000)  
433 (Davis and Sharif, 2000)



PGD<sub>2</sub> 1483 (Abramovitz et al., 2000)  
2139 (Davis and Sharif, 2000)

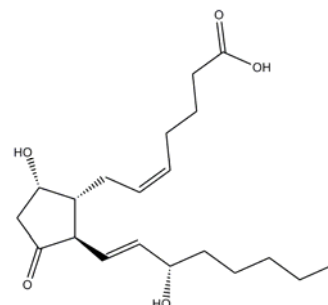


Figure 1

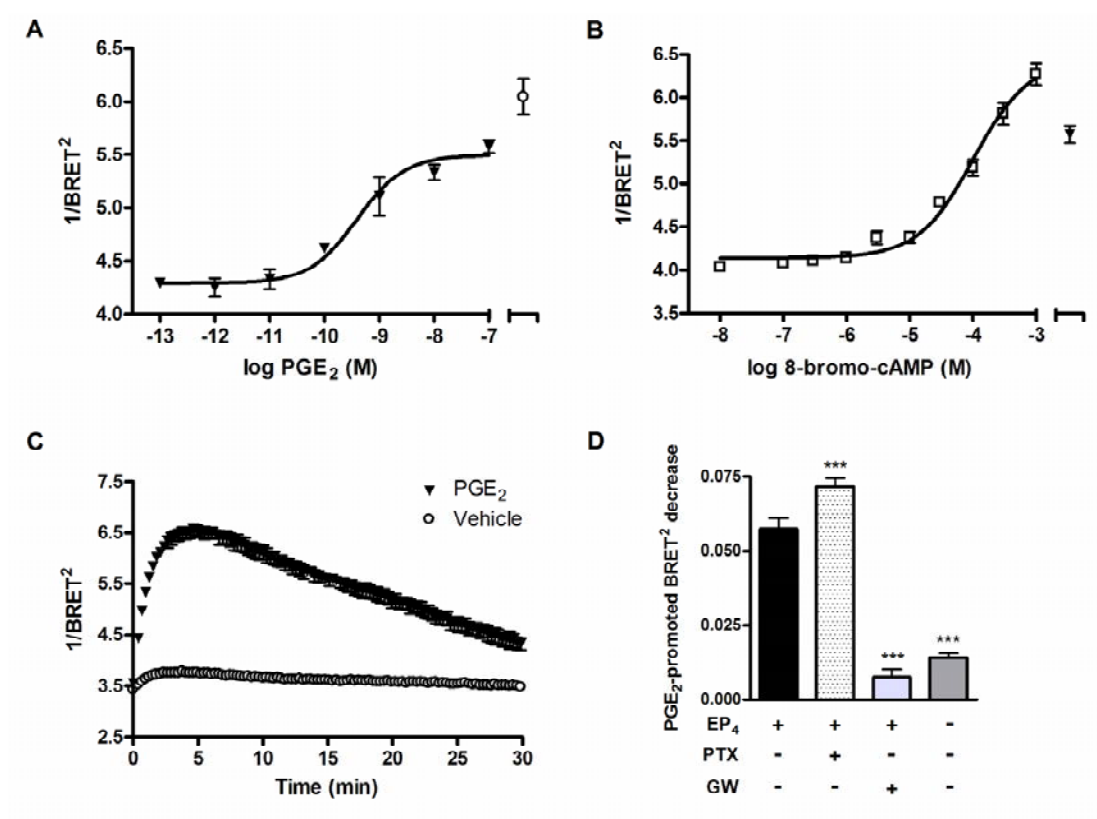


Figure 2

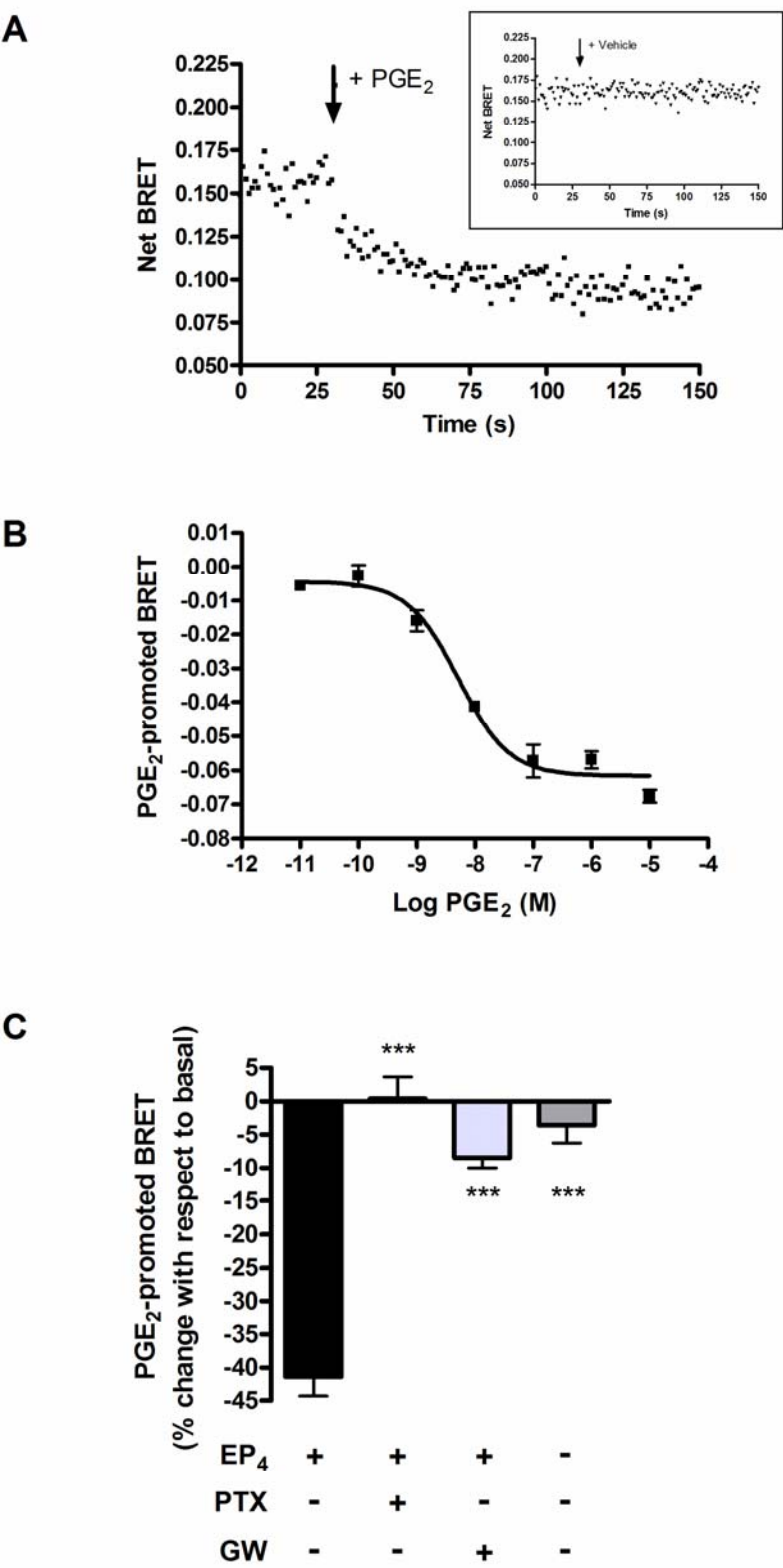
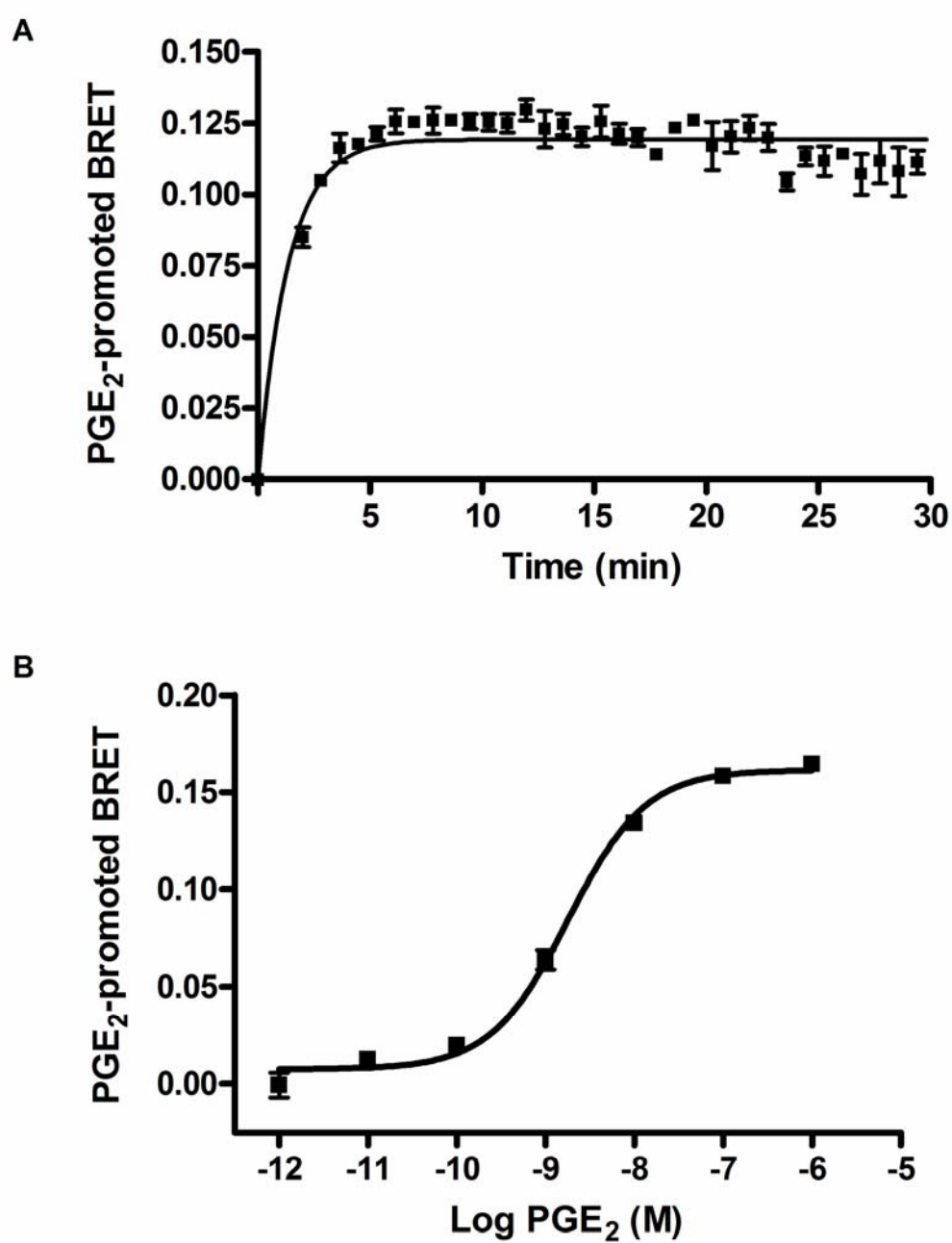


Figure 3



**Figure 4**

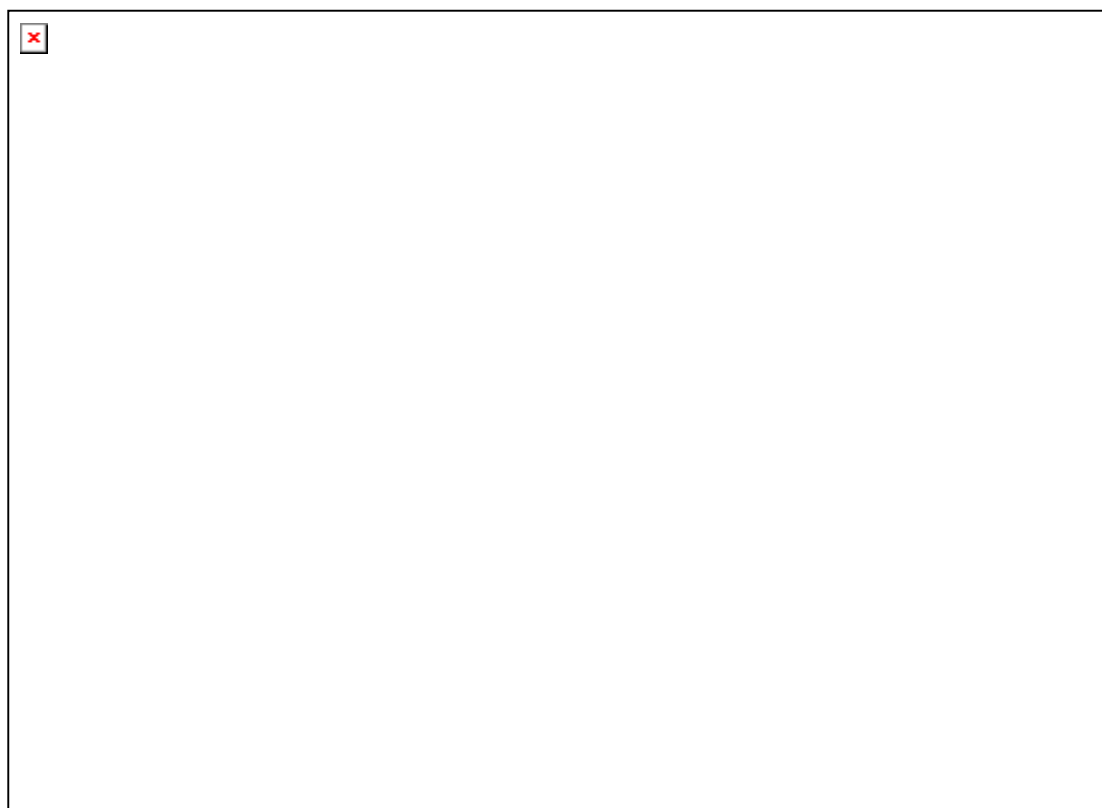
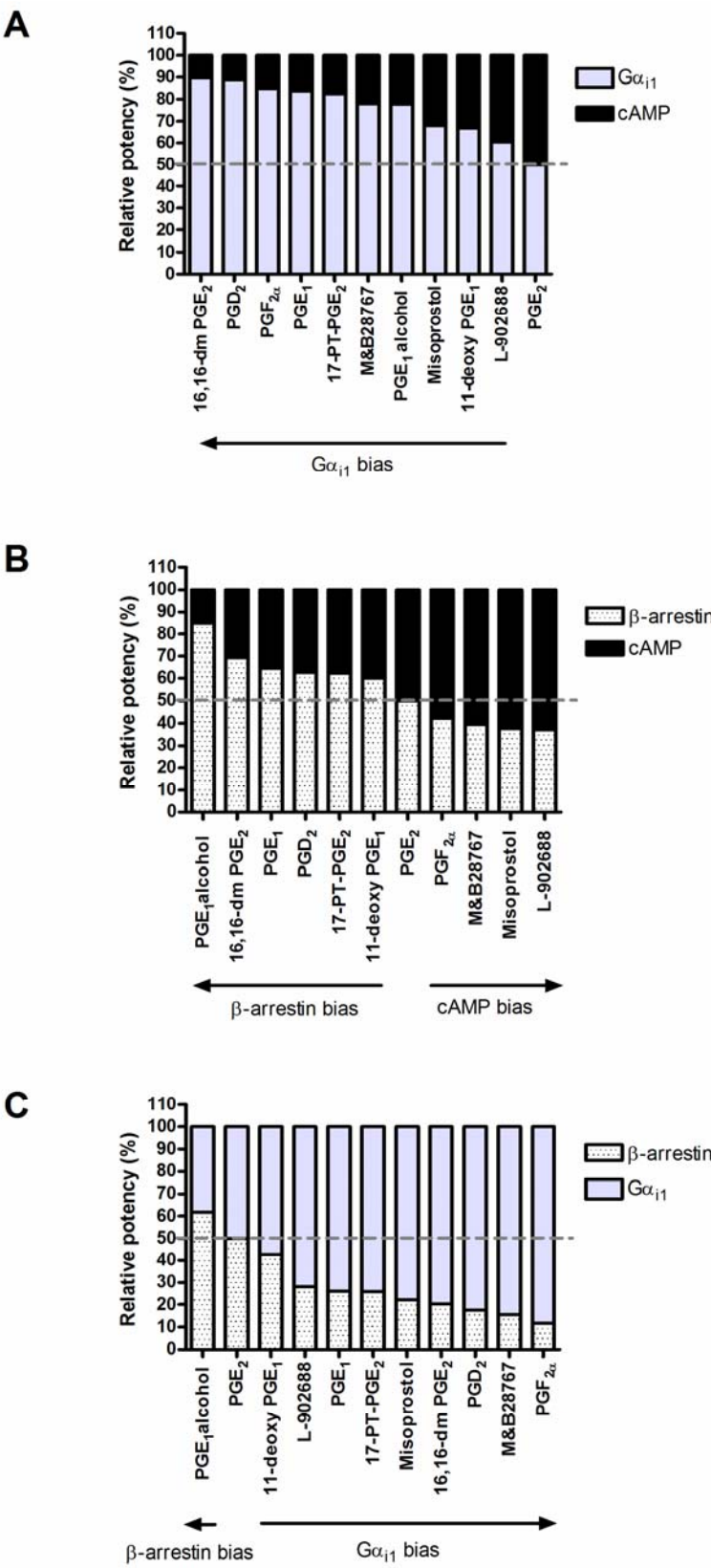
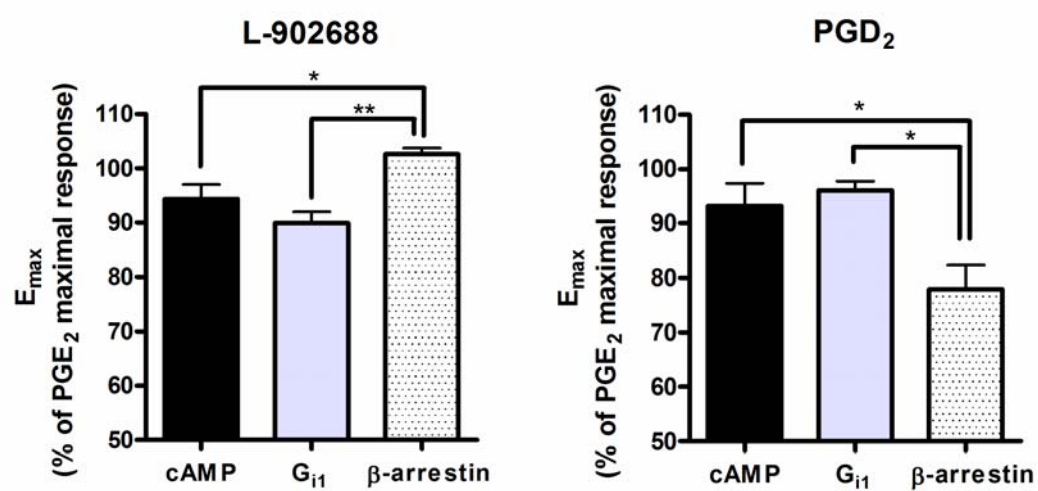


Figure 5



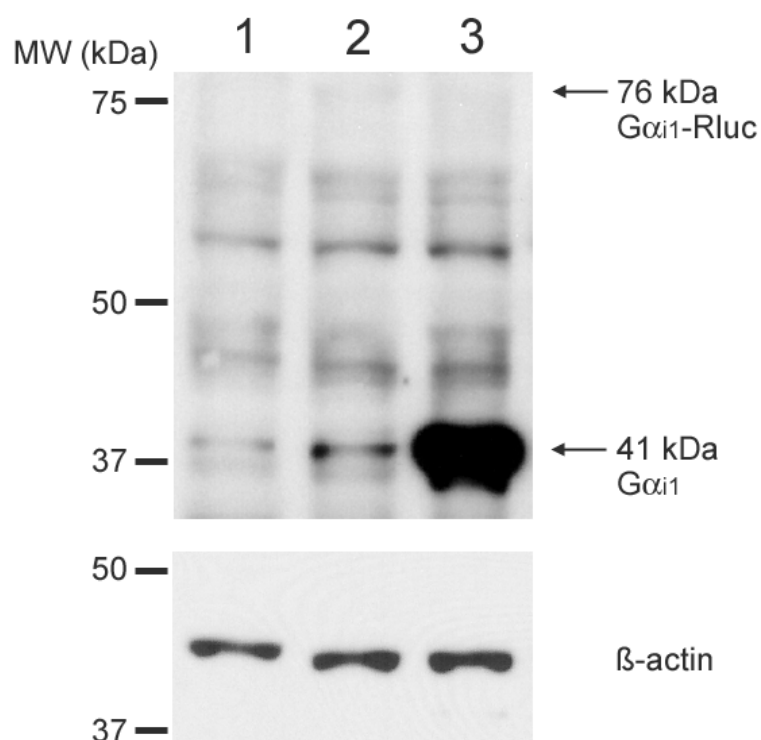
**Figure 6**

**Supplemental data**

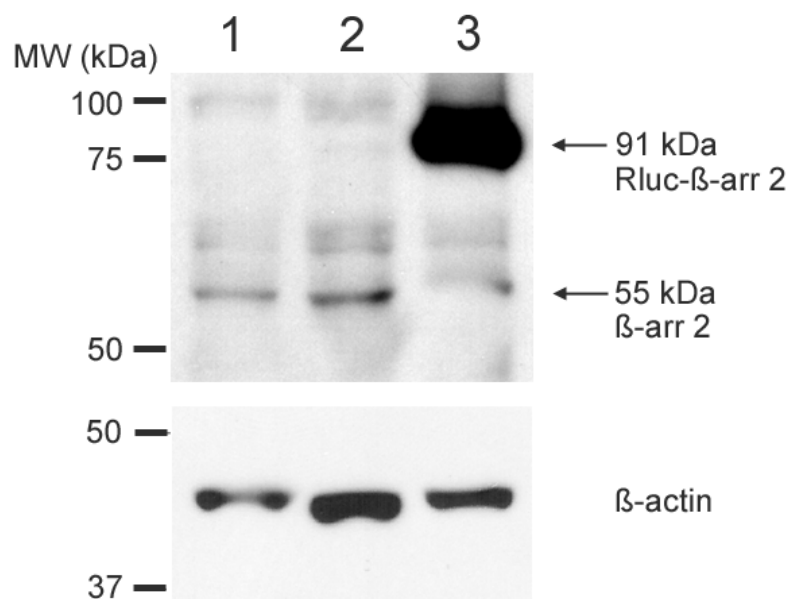
**Supplementary Table 1. EP<sub>4</sub> receptor expression level in HEK 293 cells transfected for BRET assays.** Expression levels were estimated by radioligand binding using a saturating concentration (20nM) of [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>. No specific binding was detected in untransfected cells. Data represent means ± S.E.M. of 2 independent experiments performed in triplicate.

<b>Transfected DNA</b>	<b>fmol/mg protein</b>
GFP10-Epac-Rluc3 / EP <sub>4</sub>	152 ± 53
Gα <sub>i1</sub> -Rluc / YFP-Gβ <sub>1</sub> / Gγ <sub>2</sub> / EP <sub>4</sub>	291 ± 55
Rluc-β-arrestin 2 / EP <sub>4</sub> -YFP	355 ± 147





**Supplementary Fig. 1.** Gα<sub>i1</sub> expression level in transfected HEK 293 cells. Cells were transfected with: empty vector (lane 1), BRET assay conditions (Gα<sub>i1</sub>-Rluc/YFP-Gβ<sub>1</sub>/Gγ<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub>; lane 2) or high levels of Gα<sub>i1</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> (lane 3) as a positive control. Lysed cell extracts were separated by standard SDS-PAGE techniques in a 9% acrylamide gel and immunoblotted with an anti-Gα<sub>i1</sub> R4 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Blots were stripped and reprobed with an antibody recognizing β-actin (C4; Santa Cruz Biotechnology) to control protein loading. The predicted molecular weight of detected proteins (41 kDa (Gα<sub>i1</sub>) and 76 kDa (Gα<sub>i1</sub>-Rluc)) are indicated by arrows.



**Supplementary Fig. 2.**  $\beta$ -arrestin 2 expression level in transfected HEK 293 cells. Cells were transfected with: empty vector (lane 1), BRET assay conditions (Rluc- $\beta$ -arrestin 2/EP<sub>4</sub>-YFP; lane 2) or high levels of Rluc- $\beta$ -arrestin 2 (lane 3) as a positive control. Lysed cell extracts were separated by standard SDS-PAGE techniques in a 9% acrylamide gel and immunoblotted with an anti- $\beta$ -arrestin 2 H-9 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Blots were stripped and reprobed with an antibody recognizing  $\beta$ -actin (C4; Santa Cruz Biotechnology) to control protein loading. The predicted molecular weight of detected proteins (55 kDa ( $\beta$ -arrestin 2) and 91 kDa (Rluc- $\beta$ -arrestin 2)) are indicated by arrows.

## **Article 2**

**Restoration of renal functions by a novel prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor-derived peptide in a rat model of acute renal failure**

**Restauration des fonctions rénales par un nouveau peptide dérivé du récepteur de prostaglandine EP<sub>4</sub> dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë chez le rat**

**Martin Leduc**, Xin Hou, Daniel Abran, Jean-Claude Honoré, David Hamel, Daya R. Varma, Joseph A. Mancini, Krishna G. Peri, Nikolaus Heveker et Sylvain Chemtob

*En préparation pour soumission prochaine.*

**Restoration of renal functions by a novel prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor-derived peptide in a rat model of acute renal failure**

Martin Leduc<sup>1,2</sup>, Xin Hou<sup>1</sup>, Daniel Abran<sup>3</sup>, Jean-Claude Honoré<sup>1,4</sup>, David Hamel<sup>1,4</sup>, Daya R. Varma<sup>5</sup>, Joseph A. Mancini<sup>5</sup>, Krishna G. Peri<sup>4</sup>, Nikolaus Heveker<sup>1,2</sup> and Sylvain Chemtob<sup>1,4,5</sup>.

<sup>1</sup> Research Center/CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada;

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada;

<sup>3</sup> Theratechnologies inc., Montréal, Québec, H4S 2B4, Canada;

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada;

<sup>5</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, H3G 1Y6, Canada.

**Running Title :** EP4 peptide and renal function

**Number of words in Abstract :** 235

**Number of words in text :** 2948

**Correspondence :** Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D., FRCPC; Departments of Pediatrics, Ophthalmology, and Pharmacology, Research Center, CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada.

## **Abstract**

Acute renal failure is a serious medical complication characterized by an abrupt and sustained decline in renal function. However, despite significant advances in supportive care there is currently no effective treatment to restore renal function. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is a lipid hormone mediator abundantly produced in the kidney where it acts locally to regulate renal function; several studies suggest that modulating EP<sub>4</sub> receptor activity could improve renal functions following kidney injury. We derived lead peptides from extracellular juxtamembranous regions of the EP<sub>4</sub> receptor following the rationale that peptides that target regions of the receptor remote of the ligand-binding site might modulate a subset of the EP<sub>4</sub>-mediated activities. It was found that the optimized peptidomimetic THG213.29 antagonized EP<sub>4</sub>-mediated relaxation of piglet saphenous vein rings and markedly increased kidney functions (glomerular filtration rate, renal plasma flow and urine output) in normal dogs, rats and pigs. As well, THG213.29 significantly improved renal functions and histological changes in acute renal failure induced by either cisplatin or renal artery occlusion in Sprague-Dawley rats. THG213.29 did not displace PGE<sub>2</sub> binding to EP<sub>4</sub>, but modulated PGE<sub>2</sub> binding dissociation kinetics, indicative of an allosteric binding mode. THG213.29 exhibited functional selectivity, as it partially inhibited EP<sub>4</sub>-mediated cAMP production but did not affect Gα<sub>i</sub> activation or β-arrestin recruitment. Our results demonstrate that THG213.29 represents a novel class of diuretic agent with noncompetitive allosteric modulator effects on EP<sub>4</sub> receptor function for improving renal function following acute renal failure.

## **Introduction**

Acute renal failure (ARF) is characterized by an abrupt and sustained decline in the glomerular filtration rate (Venkataraman and Kellum, 2007b). Despite significant advances in supportive therapy over the last few decades, ARF remains a serious medical condition associated with high levels of morbidity and mortality (de Mendonca et al., 2000; Kellum and Angus, 2002). Depending on the definition used, ARF has been reported to affect from 1% to 25% of patients admitted to intensive care units and has led to mortality rates from 15% to 60% (Kellum, 2008). Based on the progress made in understanding the pathophysiology of ARF, many therapeutic agents have been developed and tested in animal models of ARF (Lameire et al., 2005). However, only limited success has been achieved in human clinical trials with pharmacological agents such as loop diuretics, mannitol, dopamine receptor agonists, atrial natriuretic peptide, adenosine antagonists, N-acetylcysteine, insulin-like growth factor-1 and calcium entry blockers (Lameire et al., 2005; Venkataraman and Kellum, 2007b). The lack of effective treatments for ARF warrants the identification of new molecular targets and approaches to develop efficient therapeutic agents for the treatment of renal insufficiency.

Prostaglandins which are derivatives of cyclooxygenase-catalyzed conversion of arachidonic acid are potent mediators of renal function and hemodynamics (Farman et al., 1987; Breyer and Breyer, 2001). PGE<sub>2</sub> is one of the major prostanoids found in the kidney and it exerts its biological actions through one of the four EP receptors, EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub>. The EP<sub>4</sub> receptors are predominantly expressed in the glomerulus and in preglomerular vessels, but they are also expressed in the distal convoluted tubule, cortical collecting duct and outer medullary vasa recta (Breyer et al., 1996; Jensen et al., 2001). Activation of EP<sub>4</sub> by PGE<sub>2</sub> has a vasodilatory effect on renal vascular tone (Schweda et al., 2004), stimulates renin release in juxtaglomerular cells (Friis et al., 2005) and promotes cell survival of podocytes (Aoudjit et al., 2006). An EP<sub>4</sub>-specific agonist was found to reduce nephrotoxic injury and increase the survival rate of rats with mercury chloride-induced ARF (Vukicevic et al., 2006), and an EP<sub>4</sub> agonist prevented the development of glomerulonephritis (Nagamatsu et al., 2006).

These studies suggest that modulating EP<sub>4</sub> receptor activity could improve renal functions in ARF.

The concept that peptides corresponding to specific sequences of proteins can interfere with their activity has been abundantly documented (McDonnell et al., 1996; Quiniou et al., 2008; Samoilova et al., 2008). Along these lines, there is increasing evidence that peptides derived from various extracellular and juxtamembranous regions of GPCRs can interfere with their respective activities, as demonstrated for example for the prostaglandin F<sub>2α</sub> (Peri et al., 2002; Goupil et al., 2010), vasopressin type 2 (Rihakova et al., 2009), and β<sub>2</sub> adrenergic (Hebert et al., 1996) receptors. Peptides that target regions of the receptor remote from the orthosteric natural ligand-binding site might exhibit non-competitive allosteric properties and modulate only a subset of the receptor-mediated activities, allowing more specific pharmacological intervention targeting some, but not all, receptor signaling pathways. This concept, referred to as functional selectivity, has been described for numerous compounds (Galandrin et al., 2007; Urban et al., 2007a) including non-competitive antagonists (Kenakin, 2007a; Leach et al., 2007).

Based on this rationale, we derived peptides from extracellular juxtamembranous regions of EP<sub>4</sub> and screened them for their effects on renal functions. Here we describe the optimized peptidomimetic, THG213.29, which proved to be efficacious in improving functional and structural renal variables in both ischemia- and nephrotoxin-based rat models of ARF.

## **Results**

### **Screening of peptides derived from EP<sub>4</sub> extracellular juxtamembranous regions**

Initially, seven D-octapeptides synthesized in reverse order from the protein sequence were derived from each of the extracellular juxtamembranous regions of the human EP<sub>4</sub> receptor; the chosen regions exhibited homology to rat, mouse, dog and bovine EP<sub>4</sub> receptors. Peptides were screened by testing their ability to affect PGE<sub>2</sub>-induced vasodilation of piglet saphenous vein ring preparations. This complex, multi-signal-dependent physiological functional assay was used to avoid a screening bias towards classical, but potentially non-relevant signaling pathways. Peptide THG213 (iftsyecI; Fig. 1b), derived from the first extracellular loop (ECL1) and transmembrane 3 (TM3) junction (Fig. 1a), proved to be the most effective. Several derivatives of this peptide were generated and tested for their ability to inhibit PGE<sub>2</sub>-induced vasodilation, to increase GFR in the rat renal artery occlusion model, as well as for improved solubility (results not shown). The most promising compound, peptidomimetic THG213.29 [L-(4,4)-biphenyl alanine-(all D) tsyea-(all L) LKK; Fig. 1c], was selected for further characterization.

### **Effects of THG213.29 on EP<sub>4</sub>-mediated vasorelaxation**

PGE<sub>2</sub> exerts a vasodilatory effect on piglet saphenous veins, due predominantly to the presence of EP<sub>4</sub> receptors (Wilson and Giles, 2005). Exposure to 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> caused relaxation of saphenous vein rings contracted with the thromboxane receptor (TP) agonist U-46619. Pre-treatment of the rings with 1  $\mu$ M THG213.29 inhibited the PGE<sub>2</sub>-mediated vasodilation by nearly 50% (Fig. 2a); THG213.29 alone did not cause any vasomotor effect (results not shown). Moreover, treatment of rings with 10 nM of the EP<sub>4</sub>-selective agonist L-902688 (Young et al., 2004) also led to the relaxation of the U-46619-induced vasoconstriction, confirming the role of EP<sub>4</sub> in smooth muscle relaxation in this tissue. Importantly, pre-treatment of the saphenous vein rings with 1  $\mu$ M of THG213.29 inhibited the L-902688-mediated relaxation by 51% (Fig. 2b), demonstrating that THG213.29 specifically inhibited EP<sub>4</sub>-mediated vasorelaxation.



### **Effect of THG213.29 on normal dog, rat and pig kidney functions**

We next tested the *in vivo* effects of THG213.29 on renal functions of control Sprague-Dawley rats, Beagle dogs and juvenile pigs. GFR was significantly increased with a maximal effect found at a dose of 2 mg/kg in rats and pigs and at 5 mg/kg in dogs (Fig. 3a). Renal plasma flow and urine output were also significantly augmented following THG213.29 administration in normal rats, dogs and pigs (Fig. 3b, c), indicating that THG213.29 is effective in a species-independent manner.

### **Efficacy of THG213.29 in a cisplatin-induced nephrotoxic acute renal failure rat model**

Nephrotoxic effects resulting from the use of antineoplastic, radiocontrast and antimicrobial agents are known to result in ARF (Nash et al., 2002). Cisplatin is a common and effective chemotherapeutic agent used for the treatment of various malignancies with unfortunate dose-limiting nephrotoxicity observed in 25-35% of treated patients (Ries and Klastersky, 1986). We tested the efficacy of THG213.29 in a cisplatin-induced nephrotoxicity rat model of acute tubular necrosis and renal failure. Administration of cisplatin to Sprague-Dawley rats led to a dramatic decline in GFR, renal plasma flow and urine output, measured five days later (Fig. 4a), and consequently to a progressive increase of serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels (Fig. 4b). No changes were observed in plasma levels of proteins, bicarbonates, sodium and chloride (results not shown). Administration of a single dose of THG213.29 (1 mg/kg) on day 5 improved kidney function parameters, which were completely restored in rats treated with THG213.29 three times a day (5 mg/kg) from days 2 to 5 (Fig. 4a). BUN and serum creatinine levels measured on day 5 had decreased, albeit not significantly, after the latter treatment (Fig. 4b). Histological assessment of kidneys 72h after the 5-day cisplatin protocol revealed hypertrophy and/or erythrocyte extravasation in the majority of glomeruli as well as occlusion of a small portion of collecting ducts in cisplatin-treated rats; treatment of rats with THG213.29 (5 mg/kg, three times a day) practically eliminated glomerular hypertrophy and periglomerular erythrocyte extravasation, while the effect on

collecting duct occlusion was not significant (Fig. 4c, d). Overall, these results show that THG213.29 has a positive effect on renal functions and glomerular structure under pathological conditions of nephrotoxin-induced ARF.

### **Efficacy of THG213.29 in a renal artery occlusion rat model of acute renal failure**

A variety of clinical conditions including haemorrhage, heart failure, volume depletion and shock can lead to compromised renal blood flow and ischemia accounts for the largest number of cases of ARF (Thadhani et al., 1996). Hence, the efficacy of THG213.29 was assessed in the widely used ischemic renal artery occlusion (RAO) rat model of ARF. In this model, the effect of THG213.29 was compared to fenoldopam, a selective dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist that has been shown to improve renal perfusion and decrease serum creatinine in limited clinical studies (Venkataraman and Kellum, 2007b). Bilateral renal artery clamping was carried out for 60 minutes to induce acute renal ischemia, leading subsequently to an important decrease of kidney function parameters. As illustrated in Fig. 5a, administration of either THG213.29 (1 mg/kg) or fenoldopam resulted in increased urine output, but only THG213.29 and not fenoldopam proved effective in significantly augmenting GFR and renal plasma flow. Moreover, THG213.29 and fenoldopam were equally efficacious in decreasing BUN and serum creatinine levels after 72 h (Fig. 5b). Histological examination of kidneys collected 72 h after renal ischemia indicated ultrastructural damage compared to sham-operated rats, showing periglomerular erythrocyte extravasation and tubular obstruction with cell debris (Fig. 5c-g). Both of these histological parameters were considerably reduced in rats treated with THG213.29. Globally, these results indicate that THG213.29 is beneficial in improving renal functions and protecting against structural tissue damage following ischemia-reperfusion-induced ARF.

### **Effect of THG213.29 on PGE<sub>2</sub> binding and dissociation kinetics**

To better delineate the interaction of THG213.29 on the EP<sub>4</sub> receptor, we performed competitive binding experiments to determine if THG213.29 bound to the same EP<sub>4</sub>

site as PGE<sub>2</sub>. As expected, unlabeled PGE<sub>2</sub> dose-dependently displaced bound [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> in 293/EP<sub>4</sub> cells (Fig. 6a). However, THG213.29 did not displace bound [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>, indicating that it did not compete for the EP<sub>4</sub> orthosteric natural ligand binding site; this suggested that it might bind to an allosteric site of the receptor. THG213.29 was able to modulate the [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> dissociation rate in radioligand dissociation kinetics experiments (Fig. 6b). Indeed, addition of excess unlabeled PGE<sub>2</sub> resulted in bound [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> dissociation with a half life (*t*<sub>1/2</sub>) of 9.83 ± 0.95 min and a corresponding *k*<sub>off</sub> of 0.073 ± 0.008 min<sup>-1</sup>, while in the presence of THG213.29, the dissociation *t*<sub>1/2</sub> was significantly increased to 14.4 ± 1.3 min and the *k*<sub>off</sub> accordingly decreased to 0.049 ± 0.004 min<sup>-1</sup>. These results are in line with the properties of an allosteric ligand, as a key manifestation of an allosteric interaction is an alteration of the affinity of an orthosteric ligand for its binding site, and thus of its association and/or dissociation rates (May et al., 2007).

### Functional selectivity of THG213.29

We next verified the effects of THG213.29 on some of the major EP<sub>4</sub>-mediated signaling pathways. As EP<sub>4</sub> is classically described to couple to Gα<sub>s</sub>/adenylate cyclase activation, we first measured cAMP production in EP<sub>4</sub>-transfected HEK293E cells co-expressing the previously characterized bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based Epac biosensor (Leduc et al., 2009) that allows measurement of changes in intracellular cAMP levels in living cells. Stimulation with PGE<sub>2</sub> resulted in a dose-dependent increase in cAMP production (*pEC*<sub>50</sub> of 9.63 ± 0.16), while pre-treatment of cells with THG213.29 (100 μM) reduced the *E*<sub>max</sub> of PGE<sub>2</sub> by 23% without affecting PGE<sub>2</sub> potency (*pEC*<sub>50</sub> of 9.74 ± 0.19) (Fig. 7a). The potency of THG213.29 to inhibit EP<sub>4</sub>-mediated cAMP production was low (*pIC*<sub>50</sub> of -5.52 ± 0.68) but specific, as no inhibition of PGE<sub>2</sub>-mediated cAMP production was observed in HEK293E cells transfected with the closely related prostaglandin EP<sub>2</sub> receptor, nor of AVP-mediated cAMP production by the vasopressin 2 receptor (Fig. 7b). Moreover, the intrinsic effect of THG213.29 alone was neutral on cAMP production in EP<sub>4</sub>-transfected cells (Fig. 7b). As EP<sub>4</sub> signaling has also been shown to involve coupling to PTX-sensitive Gα<sub>i</sub> proteins (Fujino and Regan, 2006; Leduc et al., 2009)

and  $\beta$ -arrestin mediated effects (Buchanan et al., 2006; Leduc et al., 2009), we also verified the effect of THG213.29 on these two other EP<sub>4</sub> signaling outcomes in living cells using previously characterized BRET assays (Leduc et al., 2009). THG213.29 had no intrinsic effect itself or no modulatory effect on PGE<sub>2</sub>-induced structural rearrangements within the G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  heterotrimeric G protein (reflecting activation of G $\alpha_{i1}$ ; Fig. 7c) or on  $\beta$ -arrestin recruitment to the receptor (Fig. 7d) in EP<sub>4</sub>-expressing HEK293E cells. Opposingly, the orthosteric EP<sub>4</sub>-specific antagonist GW627368X completely abrogated the PGE<sub>2</sub>-induced response in these assays. These results reveal the pharmacological selectivity of THG213.29, as it partially inhibited EP<sub>4</sub>-mediated cAMP production without affecting two other signaling outcomes of the receptor.

## **Discussion**

On the basis that extracellular loops and the extracellular portions of transmembrane helices play an important role in the overall pharmacology of GPCRs (Cherezov et al., 2007) and that there is a conformational coupling between the extracellular surface and the orthosteric binding site (Bokoch et al.), we rationally designed peptides that reproduce juxtamembranous regions of the EP<sub>4</sub> receptor. THG213.29 was derived from a region that is distinct from the presumed EP<sub>4</sub> orthosteric binding site, which is located in the case of the closely related prostacyclin receptor mostly within the transmembrane core (Stitham et al., 2003). Consequently, THG213.29 exhibited non-competitive properties towards EP<sub>4</sub> as it did not displace bound PGE<sub>2</sub>, although it modulated PGE<sub>2</sub> binding dissociation kinetics (Fig. 6). The noncompetitive nature of THG213.29 is corroborated by the inability of high concentrations of PGE<sub>2</sub> to overcome inhibitory effects of THG213.29 on PGE<sub>2</sub>-induced cAMP production (insurmountable antagonism) (Fig. 7a); in contrast, competitive orthosteric antagonism by definition can be surmounted by increasing concentrations of the natural ligand (Matthews, 1993). THG213.29 exerted specificity for the EP<sub>4</sub> receptor, as it inhibited the EP<sub>4</sub>-specific agonist L-902688-mediated piglet saphenous vein vasodilation (Fig. 2b), attenuated cAMP response in EP<sub>4</sub> but not EP<sub>2</sub> or V2R-expressing HEK293 cells (Fig. 7b) and modulated PGE<sub>2</sub> binding dissociation kinetics to the EP<sub>4</sub> receptor (Fig. 6b).

In the past several years, it has become increasingly clear that G-protein coupled receptors can activate independently a variety of signaling effectors, and that the ability of a compound to modulate a given signaling pathway cannot be extrapolated to another signaling pathway triggered by the same receptor. The conceptual basis for this is that GPCRs do not have merely “inactive” and “active” conformations, but that ligands can stabilize distinct receptor conformations, which are more or less potent and efficient in activating a given readout (Kenakin, 2003). This infers that a drug can affect some, but not all, functions evoked by a receptor, a concept referred to as functional selectivity (Urban et al., 2007a). The difficulty to accommodate functional selectivity in screening campaigns has been pointed out

(Kenakin, 2009b); hence, we initially used a complex isolated-tissue physiological functional assay (piglet saphenous vein vasorelaxation) to determine the efficacy of peptides to avoid overseeing signaling responses based on reductionist in vitro recombinant systems. THG213.29 inhibited both PGE<sub>2</sub> and L-902688-mediated vasorelaxation in this system. In an effort to decipher the effect of THG213.29 on EP<sub>4</sub> activities, we then investigated more specific signaling pathways using BRET-based assays in living HEK293 cells. EP<sub>4</sub>-mediated cAMP production was partially but specifically inhibited by THG213.29, while the G $\alpha_{i1}$  activation and  $\beta$ -arrestin recruitment pathways activated by PGE<sub>2</sub> were unaffected by THG213.29 (Fig. 7). The observed functional selectivity is likely made possible by THG213.29-induced stabilization of a unique receptor conformation that in essence creates a “new” receptor with distinct functional properties, characteristic of allosteric modulators. The modulation of specific receptor activities may confer greater selectivity and possibly reduce undesirable side effects, as compared to orthosteric antagonists that block all (beneficial and pathological) responses of the receptor to stimuli (Kenakin, 2007a).

Using the EP<sub>4</sub>-selective agonist CP-044,519-02, Vukicevic and colleagues have previously shown that EP<sub>4</sub> agonism reduces serum creatinine levels, proximal tubular necrosis and number of apoptotic cells in a nephrotoxic mercury chloride rat model of ARF (Vukicevic et al., 2006). We have shown that THG213.29 is a negative modulator of EP<sub>4</sub>-mediated cAMP production and saphenous vein vasorelaxation but has no effect on EP<sub>4</sub>-mediated G $\alpha_i$  activation or  $\beta$ -arrestin recruitment, and it is not presently known if these properties are central to the efficacy of THG213.29 in salvaging renal functions in vivo. Because the nature and extent of allosteric modulation may vary according to the cellular and tissue environment (Childers et al., 2005), it cannot be excluded that a different THG213.29 efficacy profile than the one we observed in our in vitro recombinant systems would be obtained in vivo under pathological ARF conditions. Moreover, other EP<sub>4</sub> receptor activities that we have not examined or are not yet characterized may also be modulated (positively or negatively) by THG213.29 and may be implicated in the therapeutic activity of the peptide. The EP<sub>4</sub> receptor data in the kidney has a corollary in the control of patent

ductus arteriosus (DA) (Ivey and Srivastava, 2006). The use of an EP<sub>4</sub> agonist maintains the DA patent even when dosed with indomethacin. The quandary in this case is that the EP<sub>4</sub> receptor null mice also results in a patent DA. PGE<sub>2</sub> has been shown to have both constrictor and dilatory functions acting through the EP<sub>4</sub> receptor. PKA activation after EP<sub>4</sub> stimulation can directly promote vasodilatation by inhibiting myosin light chain kinase and maintains the DA patent during fetal development. PKA activation can also result in stimulation of hyaluronic acid formation which forms a basis for extracellular matrix and DA closure. Signaling paths downstream of the EP<sub>4</sub> receptor are clearly complex and can be divergent dependent on timing and the environment of the challenge. Further decoding of THG213.29 effects on EP<sub>4</sub> function will thus be needed in the future to fully understand its mode of action. However, regardless of the mechanism, our results clearly indicate that treatment with THG213.29 provides a significant improvement of renal function in two distinct rat models of ARF.

Despite improved supportive care, ARF remains a serious clinical condition associated with high mortality and morbidity which have not significantly decreased over the past few decades. PGE<sub>2</sub> and its receptors, including EP<sub>4</sub>, are widely expressed in the kidney and regulate renal functions. As the most common cause ( $\approx 85\%$ ) of intrinsic ARF is tubular injury, which can be of ischemic or nephrotoxic origin (Thadhani et al., 1996), the efficacy of the EP<sub>4</sub>-derived peptide THG213.29 was evaluated in two different animal models of ARF which reproduce many features of the human ischemia- and toxin-induced pathologies (Heyman et al., 2002). In both models, treatment of rats with THG213.29 caused a significant improvement in renal functions; it augmented GFR, renal plasma flow and urine output compared to saline-treated animals (Figs. 4a and 5a). Administration of THG213.29 also resulted in reduced BUN and serum creatinine levels, although this decrease was only statistically significant in the RAO model (Figs. 4b and 5b). Moreover, ultrastructural damage to the glomeruli and tubules was reduced by treatment with THG213.29 in both models. Altogether, these results strongly suggest that THG213.29 is efficacious in improving renal functions as well as in protecting from and/or repairing damage to renal tissue resulting from either ischemic or nephrotoxic insults. Importantly, the fact

that THG213.29 was able to increase GFR, renal plasma flow and urine output in three different species (rats, dogs and pigs) suggests that this drug could also be effective in humans.

In summary, we have documented the discovery and characterization of a small peptidomimetic, THG213.29, which was rationally derived from a juxtamembranous region of the prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor. The peptide exhibited pharmacological properties consistent with those of a noncompetitive, functionally selective allosteric modulator and improved renal function in two different models of acute renal failure in rats. THG213.29 is a novel class of allosteric modulator of the EP<sub>4</sub> receptor with diuretic properties which could be exploited in the therapy of acute and possibly chronic kidney injury.



## **Concise Methods**

*Animals and reagents* – Animals were used according to a protocol of the Ste-Justine Hospital Animal Care committee and along the principles of the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* of the Canadian Council on Animal Care. PGE<sub>2</sub>, U-46619 and GW627368X were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). L-902688 (Young et al., 2004) was a kind gift from Merck Frosst (Kirkland, QC, Canada). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

*Peptide synthesis* – Peptides were synthesized using F-moc chemistry and the solid phase Merrifield method. Peptide purity was assessed by HPLC and mass spectrometry. Alternatively, peptides were custom synthesized by Elim Biopharmaceuticals (Hayward, CA).

*Vascular ring preparation* – Newborn piglets (1-4 days old) were anesthetized with halothane (1.5%) and the lower external saphenous veins removed and placed in cold Krebs buffer (120 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 27 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, pH 7.4) to which 1.5 U/ml heparin was added. The veins were cleaned of extraneous tissue and cut in 3-4 mm rings which were placed in individual jacketed 15 ml organ baths containing Krebs buffer saturated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C. The rings were equilibrated for 60 min under 2 g tension and were pre-treated or not with THG213.29 for 30 min prior to addition of U-46619 (0.2 µM). When the response to U-46619 reached a steady state, PGE<sub>2</sub> or L-902688 was added. Tension was measured by force-displacement transducers and was recorded using Work Bench software (Kent Scientific, Litchfield, CT).

*Renal functions* – All experimental procedures were performed under anesthesia. Male Sprague-Dawley adult rats (250-300g) were anesthetized using 100 mg/kg of ketamine/xylazine (9:1, w:w) injected intra-peritoneally (i.p.), female Beagle dogs

were anesthetized with an i.v. injection of thiopental (5 mg/kg) and the anesthesia continued under isoflurane, while juvenile pigs (6-10 kg) were anesthetized with 1.5% halothane. The animals were kept warm and their body temperature monitored every 15 min. Renal functions were determined as previously described (Omer et al., 1995). Briefly, the carotid artery was cannulated to measure the arterial blood pressure with a pressure transducer (Gould Easy Graph) and to collect blood samples. A catheter was inserted at the tip of the bladder to collect urine. The jugular (rats), cephalic (dogs) or femoral (pigs) vein was also catheterized for infusion of saline containing the anesthetics and [ $^3\text{H}$ ] inulin (8  $\mu\text{Ci/h}$  for rats, 10  $\mu\text{Ci/h}$  for dogs and pigs, [ $^{14}\text{C}$ ] aminohippuric acid (0.8  $\mu\text{Ci/h}$  for rats, 1  $\mu\text{Ci/h}$  for dogs and pigs. The radiolabeled compounds were allowed to equilibrate for 40 minutes. Two urine samples were collected over 10 minute periods (from 40 to 50 minutes, and from 50 to 60 minutes) while blood samples were collected at 45 and 55 minutes to assess the stability of the basal GFR. Saline or THG213.29 was administered i.v. via the jugular (rats), cephalic (dogs) or femoral (pigs) vein. Urine and blood samples were then collected every 20 minutes for an additional period of 2 h. The radioactivity in the blood and urine samples was measured with a liquid scintillation counter. Urine flow rates, GFR and RPF were determined at different times and averaged for a 60 min period starting 20 min after drug administration. Urinary volume (UV) was calculated and expressed as  $\mu\text{l}$  of urine/min corrected for the weight of the animal. GFR and RPF were calculated as the ratio of urinary [ $^3\text{H}$ ]inulin to plasma [ $^3\text{H}$ ]inulin or the ratio of urinary [ $^{14}\text{C}$ ]aminohippuric acid to plasma [ $^{14}\text{C}$ ]aminohippuric acid, respectively, corrected for the volume of the urine and the weight of the animal. Moreover, blood urea nitrogen and serum creatinine levels were measured using QuantiChrom assay kits (BioAssay Systems, Hayward, CA).

*Cisplatin-induced model of acute renal failure* - ARF and tubular necrosis was induced by i.p. injection of 17.5 mg/kg of cisplatin to Sprague-Dawley male rats on day 1. Rats were treated (i.v.) with saline or THG213.29, either 1 mg/kg on day 5 or 5 mg/kg three times a day from days 2 to 5. Renal function was then assessed on day 5, as described above.

*Ischemic renal artery occlusion model of acute renal failure* - Male Sprague-Dawley rats were cannulated and basal GFR determined as described above. The left and right renal arteries were then clamped for a period of 60 min to induce acute renal ischemia. Following the ischemic period, clamps were removed and the animals were immediately treated with THG213.29 (1 mg/kg i.v. bolus), fenoldopam (0.6 µg/kg bolus dose, followed by 0.6 µg/kg/h) or saline via the jugular vein. At the end of their assigned period, the animals were either sacrificed to obtain tissue samples or anesthetized to measure renal parameters as described above.

*Histology* – Kidneys were fixed in 10% formalin, paraffin-embedded and the specimens stained with periodic acid-Schiff stain. Histological changes were evaluated by quantitative measurements of glomerular structural changes, as well as obstruction in collecting ducts and tubules.

*Cell culture* – Human embryonic kidney (HEK) 293E (Invitrogen) and EP<sub>4</sub> stably transfected 293T cells (293/EP<sub>4</sub>) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 units/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and 200 µg/ml G418. Transient transfections were performed in 6-well or 10 cm dishes using the polyethylenimine (Polysciences, PA) method, as described previously (Leduc et al., 2009).

*Plasmids* – The expression vectors containing human EP<sub>4</sub> receptor and Gγ<sub>2</sub> were obtained from the Missouri S&T cDNA Resource Center ([www.cdna.org](http://www.cdna.org)). Plasmids encoding GFP10-Epac-Rluc3, Gα<sub>i1</sub>-91Rluc, YFP-Gβ<sub>1</sub>, EP<sub>4</sub>-YFP, and Rluc-β-arrestin 2 have been described previously (Leduc et al., 2009).

*Radioligand binding* – 293/EP<sub>4</sub> cells were incubated for 2h at 4°C in PBS/0.5% BSA (w/v) buffer with 10nM of [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>, in the presence or absence of 10µM unlabeled PGE<sub>2</sub> to determine specific binding. Cells were washed three times with PBS/0.5%

BSA and lysed with 0.2 N NaOH/0.1% Triton X-100. Bound radioactivity was measured on cell lysates with a liquid scintillation counter. For [ $^3\text{H}$ ]PGE<sub>2</sub> dissociation rate experiments, a time course of displacement was performed by removing [ $^3\text{H}$ ]PGE<sub>2</sub> (10nM) after 2 hours and replacing it with 1  $\mu\text{M}$  unlabeled PGE<sub>2</sub> in the presence or absence of THG213.29 (50  $\mu\text{M}$ ); reaction was stopped by removing the buffer and lysing the cells.

*BRET measurement* – BRET measurements were performed as described previously (Leduc et al., 2009). Briefly, transiently transfected HEK293E cells were seeded in 96-well white clear bottom microplates (ViewPlate, PerkinElmer) coated with poly-D-lysine and left in culture for 24h. Cells were washed once with PBS and the Rluc substrates coelenterazine h (for BRET<sup>1</sup> experiments; NanoLight Technology) or coelenterazine 400A (for BRET<sup>2</sup> experiments; Biotium) added at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$  to BRET buffer (PBS, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% glucose). BRET readings were collected using a Mithras LB940 plate reader (Berthold) and MicroWin2000 software. BRET<sup>1</sup> measurement between Rluc and YFP was obtained by sequential integration of the signals detected in the 460-500 nm (luciferase) and 510-550 nm (YFP) windows, whereas BRET<sup>2</sup> readings between Rluc3 and GFP10 were collected by sequential integration of the signals detected in the 365-435 nm (Rluc3) and 505-525 nm (GFP10) windows. The BRET signal was calculated as the ratio of light emitted by acceptor (YFP or GFP10) over the light emitted by donor (Rluc or Rluc3). The values were corrected to net BRET by subtracting the background BRET signal obtained in cells transfected with Rluc (BRET<sup>1</sup>) or Rluc3 (BRET<sup>2</sup>) constructs alone. Cells were treated with ligands at room temperature for 3 (G $\alpha_{i1}$ ), 10 (Epac) or 15 ( $\beta$ -arrestin) minutes prior to BRET measurements.

*Statistical analysis* – Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Curve-fitting and statistical analysis was conducted by using GraphPad Prism 4 software. Statistical difference between two groups was measured using Student t-test, and for differences between more than two groups by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

**Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). M.L. was supported by studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada, Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine and Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal. J.-C.H. holds a “Focus on Stroke” postdoctoral fellowship, N.H. is a CIHR New Investigator and S.C. holds a Canada Research Chair in Perinatology and the Leopoldine Wolfe Chair in Clinical/Translational Research for the Prevention of Age-Related Macular Degeneration.

The authors thank Hendrika Fernandez and Mélissa Paiement for excellent technical assistance.

**Statement of competing financial interests**

K.G. Peri and D. Abran are employees of Theratechnologies inc.; S. Chemtob has received funding from Theratechnologies to complete part of the research described within this manuscript.

## References

1. Venkataraman, R & Kellum, JA: Prevention of acute renal failure. *Chest*, 131: 300-8, 2007.
2. de Mendonca, A, Vincent, JL, Suter, PM, Moreno, R, Dearden, NM, Antonelli, M, Takala, J, Sprung, C & Cantraine, F: Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med*, 26: 915-21, 2000.
3. Kellum, JA & Angus, DC: Patients are dying of acute renal failure. *Crit Care Med*, 30: 2156-7, 2002.
4. Kellum, JA: Acute kidney injury. *Crit Care Med*, 36: S141-5, 2008.
5. Lameire, N, Van Biesen, W & Vanholder, R: Acute renal failure. *Lancet*, 365: 417-30, 2005.
6. Breyer, MD & Breyer, RM: G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol*, 63: 579-605, 2001.
7. Farman, N, Pradelles, P & Bonvalet, JP: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ , 6-keto-PGF<sub>1</sub>  $\alpha$ , and TxB<sub>2</sub> synthesis along the rabbit nephron. *Am J Physiol*, 252: F53-9, 1987.
8. Breyer, MD, Davis, L, Jacobson, HR & Breyer, RM: Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *Am J Physiol*, 270: F912-8, 1996.
9. Jensen, BL, Stubbe, J, Hansen, PB, Andreassen, D & Skott, O: Localization of prostaglandin E(2) EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280: F1001-9, 2001.
10. Schweda, F, Klar, J, Narumiya, S, Nusing, RM & Kurtz, A: Stimulation of renin release by prostaglandin E<sub>2</sub> is mediated by EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors in mouse kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F427-33, 2004.
11. Friis, UG, Stubbe, J, Uhrenholt, TR, Svenningsen, P, Nusing, RM, Skott, O & Jensen, BL: Prostaglandin E<sub>2</sub> EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289: F989-97, 2005.
12. Aoudjit, L, Potapov, A & Takano, T: Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes cell survival of glomerular epithelial cells via the EP<sub>4</sub> receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F1534-42, 2006.
13. Vukicevic, S, Simic, P, Borovecki, F, Grgurevic, L, Rogic, D, Orlic, I, Grasser, WA, Thompson, DD & Paralkar, VM: Role of EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptor-selective agonists of prostaglandin E(2) in acute and chronic kidney failure. *Kidney Int*, 70: 1099-106, 2006.
14. Nagamatsu, T, Imai, H, Yokoi, M, Nishiyama, T, Hirasawa, Y, Nagao, T & Suzuki, Y: Protective effect of prostaglandin EP<sub>4</sub>-receptor agonist on anti-glomerular basement membrane antibody-associated nephritis. *J Pharmacol Sci*, 102: 182-8, 2006.
15. McDonnell, JM, Beavil, AJ, Mackay, GA, Jameson, BA, Korngold, R, Gould, HJ & Sutton, BJ: Structure based design and characterization of peptides that

- inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nat Struct Biol*, 3: 419-26, 1996.
16. Quiniou, C, Sapieha, P, Lahaie, I, Hou, X, Brault, S, Beauchamp, M, Leduc, M, Rihakova, L, Joyal, JS, Nadeau, S, Heveker, N, Lubell, W, Sennlaub, F, Gobeil, F, Jr., Miller, G, Pshezhetsky, AV & Chemtob, S: Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol*, 180: 6977-87, 2008.
  17. Samoilova, M, Wentlandt, K, Adamchik, Y, Velumian, AA & Carlen, PL: Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol*, 210: 762-75, 2008.
  18. Goupil, E, Tassy, D, Bourguet, C, Quiniou, C, Wisehart, V, Petrin, D, Le Gouill, C, Devost, D, Zingg, HH, Bouvier, M, Saragovi, HU, Chemtob, S, Lubell, WD, Claing, A, Hebert, TE & Laporte, SA: A Novel Biased Allosteric Compound Inhibitor of Parturition Selectively Impedes the Prostaglandin F2{alpha}-mediated Rho/ROCK Signaling Pathway. *J Biol Chem*, 285: 25624-36, 2010.
  19. Peri, KG, Quiniou, C, Hou, X, Abran, D, Varma, DR, Lubell, WD & Chemtob, S: THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol*, 26: 389-97, 2002.
  20. Rihakova, L, Quiniou, C, Hamdan, F, Kaul, R, Brault, S, Hou, X, Lahaie, I, Sapieha, PS, Hamel, D, Shao, Z, Gobeil Jr, F, Hardy, P, Joyal, JS, Nedev, H, Duhamel, F, Beauregard, K, Heveker, N, Saragovi, HU, Guillon, G, Bouvier, M, Lubell, WD & Chemtob, S: VRQ397 (CRAVKY): a novel non-competitive V2 receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009.
  21. Hebert, TE, Moffett, S, Morello, JP, Loisel, TP, Bichet, DG, Barret, C & Bouvier, M: A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*, 271: 16384-92, 1996.
  22. Galandrin, S, Oligny-Longpre, G & Bouvier, M: The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 28: 423-30, 2007.
  23. Urban, JD, Clarke, WP, von Zastrow, M, Nichols, DE, Kobilka, B, Weinstein, H, Javitch, JA, Roth, BL, Christopoulos, A, Sexton, PM, Miller, KJ, Spedding, M & Mailman, RB: Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 320: 1-13, 2007.
  24. Kenakin, T: Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 28: 407-15, 2007.
  25. Leach, K, Sexton, PM & Christopoulos, A: Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 28: 382-9, 2007.
  26. Wilson, RJ & Giles, H: Piglet saphenous vein contains multiple relaxatory prostanoid receptors: evidence for EP4, EP2, DP and IP receptor subtypes. *Br J Pharmacol*, 144: 405-15, 2005.
  27. Young, RN, Billot, X, Han, Y, Slipetz, DA, Chauret, N, Belley, M, Metters, K, Mathieu, M-C, Greig, GM, Denis, D & Girard, M: Discovery and synthesis of

- a potent, selective and orally bioavailable EP4 receptor agonist. *Heterocycles*, 64: 437-446, 2004.
28. Nash, K, Hafeez, A & Hou, S: Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*, 39: 930-6, 2002.
  29. Ries, F & Klastersky, J: Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis*, 8: 368-79, 1986.
  30. Thadhani, R, Pascual, M & Bonventre, JV: Acute renal failure. *N Engl J Med*, 334: 1448-60, 1996.
  31. May, LT, Leach, K, Sexton, PM & Christopoulos, A: Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 1-51, 2007.
  32. Leduc, M, Breton, B, Gales, C, Le Gouill, C, Bouvier, M, Chemtob, S & Heveker, N: Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009.
  33. Fujino, H & Regan, JW: EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein. *Mol Pharmacol*, 69: 5-10, 2006.
  34. Buchanan, FG, Gorden, DL, Matta, P, Shi, Q, Matrisian, LM & DuBois, RN: Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1492-7, 2006.
  35. Cherezov, V, Rosenbaum, DM, Hanson, MA, Rasmussen, SG, Thian, FS, Kobilka, TS, Choi, HJ, Kuhn, P, Weis, WI, Kobilka, BK & Stevens, RC: High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318: 1258-65, 2007.
  36. Bokoch, MP, Zou, Y, Rasmussen, SG, Liu, CW, Nygaard, R, Rosenbaum, DM, Fung, JJ, Choi, HJ, Thian, FS, Kobilka, TS, Puglisi, JD, Weis, WI, Pardo, L, Prosser, RS, Mueller, L & Kobilka, BK: Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 463: 108-12.
  37. Stitham, J, Stojanovic, A, Merenick, BL, O'Hara, KA & Hwa, J: The unique ligand-binding pocket for the human prostacyclin receptor. Site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J Biol Chem*, 278: 4250-7, 2003.
  38. Matthews, JC: *Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics*, Boca Raton, FL, CRC Press 1993.
  39. Kenakin, T: Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 346-54, 2003.
  40. Kenakin, TP: Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 8: 617-26, 2009.
  41. Childers, SR, Li, X, Xiao, R & Eisenach, JC: Allosteric modulation of adenosine A1 receptor coupling to G-proteins in brain. *J Neurochem*, 93: 715-23, 2005.
  42. Ivey, KN & Srivastava, D: The paradoxical patent ductus arteriosus. *J Clin Invest*, 116: 2863-5, 2006.
  43. Heyman, SN, Lieberthal, W, Rogiers, P & Bonventre, JV: Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care*, 8: 526-34, 2002.
  44. Omer, S, Mulay, S, Cernacek, P & Varma, DR: Attenuation of renal effects of atrial natriuretic factor during rat pregnancy. *Am J Physiol*, 268: F416-22, 1995.



### **Figure legends**

**Figure 1.** (A) Schematic two dimensional representation of human EP<sub>4</sub> receptor indicating the juxtamembranous region from which peptide THG213 was derived. (B, C) Structure of THG213 (iftsyecI, B) and THG213.29 (L-(4,4)-biphenyl alanine-tsyeaLKK, C) peptides.

**Figure 2.** Inhibition of EP<sub>4</sub>-mediated vasomotor response in isolated piglet saphenous vein rings by THG213.29. Saphenous vein rings pre-exposed or not to THG213.29 (1  $\mu$ M) were contracted with the TP receptor agonist U-46619 (0.2  $\mu$ M) and were then exposed to 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> (A) or to 10 nM of the EP<sub>4</sub>-specific agonist L-902688 (B). Results are the mean  $\pm$  S.E.M. of 22 (PGE<sub>2</sub>-treated) or 9 (L-902688-treated) rings. \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.0001 compared to saline.

**Figure 3.** Effects of THG213.29 on kidney functions in normal rats, dogs and pigs. THG213.29 administration (i.v. bolus dose; rats and pigs: 2 mg/kg, dogs: 5 mg/kg) significantly increased GFR (A), renal plasma flow (B) and urine output (C) in normal Sprague-Dawley rats, Beagle dogs and pigs. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 (rats) or 6 (dogs, pigs) animals; \* $P$  < 0.05, \*\*\* $P$  < 0.001 compared to saline.

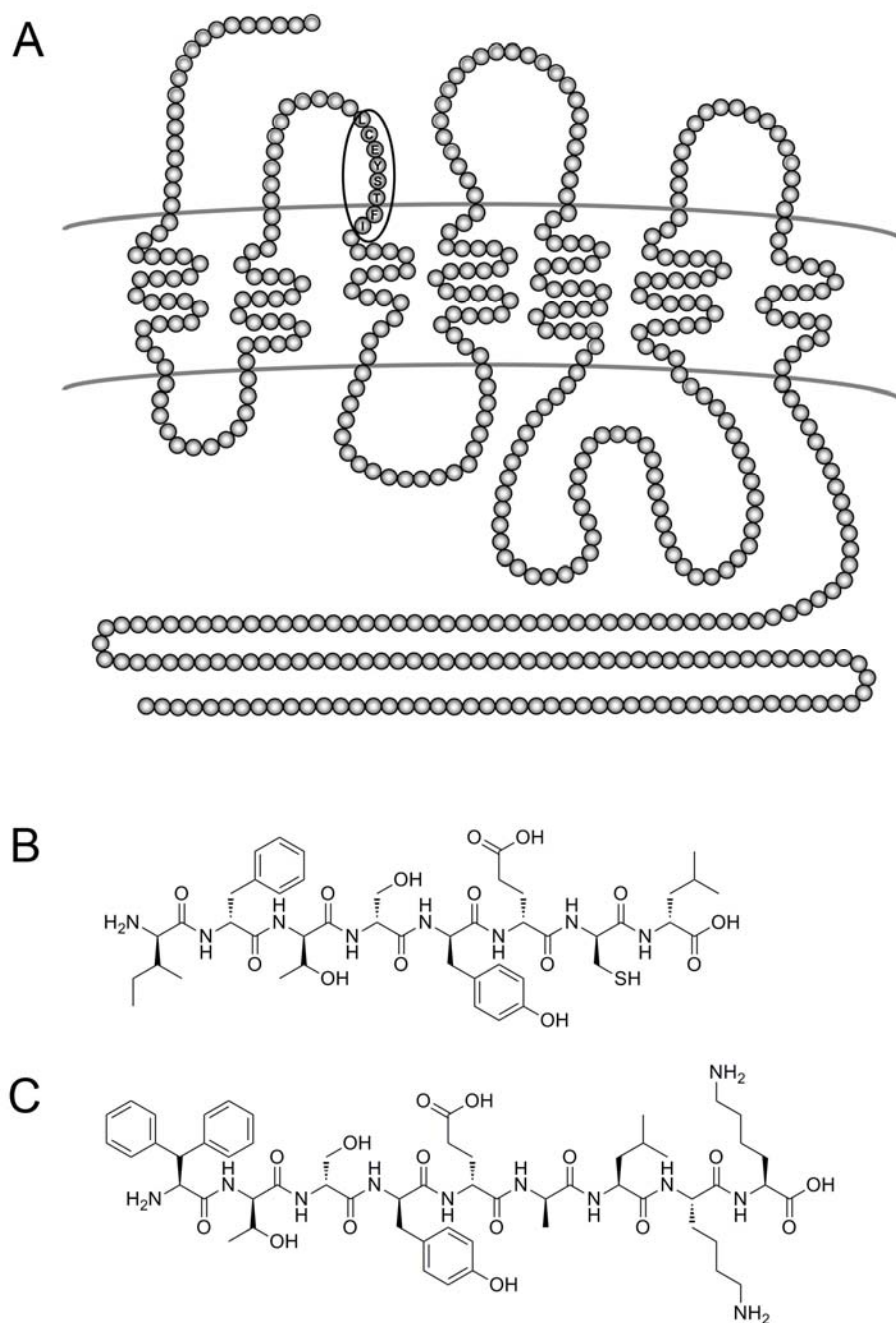
**Figure 4.** Efficacy of THG213.29 in a cisplatin-induced nephrotoxic model of acute renal failure. Sprague-Dawley rats were injected with cisplatin (17.5 mg/kg i.p.) on day 1 to induce acute tubular necrosis and renal failure. (A) Renal functions (GFR, renal plasma flow and urine output) were measured in normal untreated rats or five days after administration of cisplatin. A single administration of THG213.29 on day 5 (1 mg/kg i.v.) improved kidney functions compared to saline-treated rats; these parameters were normalized in rats treated with THG213.29 three times a day (5 mg/kg i.v.) from days 2-5. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. from 106 normal untreated rats or 4-6 rats per treatment group, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 compared to cisplatin protocol rats treated with saline; (B) BUN and serum creatinine were measured in

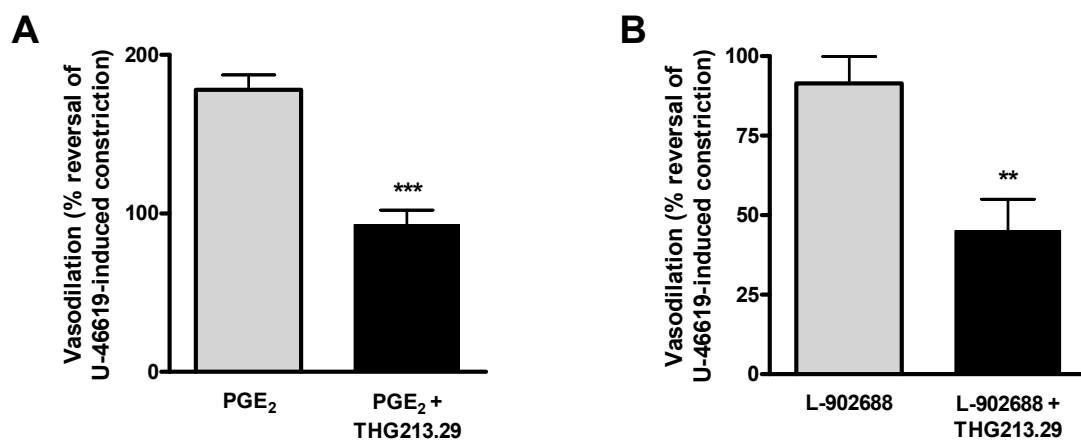
normal untreated rats and daily for five days after administration of cisplatin. Animals were treated with saline or THG213.29 three times a day (5 mg/kg i.v.) from days 2 to 5 ( $n = 4$ ); (C) kidney sections from normal (control) or cisplatin-injected rats collected 72h after treatment with saline or THG213.29 (5 mg/kg i.p., three times a day); (D) hypertrophic glomeruli and/or erythrocyte extravasation and collecting duct obstruction were quantified from histology sections. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. from 2 rats per treatment group,  $**P < 0.01$  compared to saline-treated rats.

**Figure 5.** Efficacy of THG213.29 in the ischemic renal artery occlusion (RAO) model of acute kidney injury. RAO model rats (clamped renal arteries) or sham-operated rats were treated with THG213.29 (1 mg/kg i.v. bolus dose), fenoldopam (0.6  $\mu$ g/kg bolus dose, followed by 0.6  $\mu$ g/h/kg for 2 hours) or saline immediately after renal artery unclamping; GFR, renal plasma flow and urine output were then measured over the next two hours (A) and BUN and serum creatinine levels were measured after 72 h (B). Data are the mean  $\pm$  S.E.M. from 4-6 animals per treatment group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared to renal artery clamping with saline treatment ; (C-F) kidney sections from RAO model rats were examined 24 (C, D) or 72 h (E, F) after treatment with saline (C, E) or THG213.29 (1 mg/kg, i.v. bolus dose) (D, F); (G) erythrocyte extravasation in periglomerular space (24h) and tubular occlusion (72h) were quantified from histology sections. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. from 4 rats per treatment group.

**Figure 6.** Effects of THG213.29 on the specific binding and dissociation kinetics of [ $^3$ H]PGE<sub>2</sub> binding to EP<sub>4</sub> receptors. (A) Displacement of bound [ $^3$ H]PGE<sub>2</sub> (10 nM) by increasing concentrations of unlabeled PGE<sub>2</sub> or THG213.29 in HEK293/EP<sub>4</sub> cells. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments, each performed in duplicate. (B) Dissociation kinetics of [ $^3$ H]PGE<sub>2</sub> (10 nM) binding by excess unlabeled PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) in the presence or absence of THG213.29 (50  $\mu$ M) in HEK293/EP<sub>4</sub> cells. Data from one representative experiment are shown. Inset shows mean  $\pm$  S.E.M. of dissociation half life from 4 experiments, each performed in duplicate;  $**P < 0.01$ .

**Figure 7.** Functional selectivity of THG213.29. (A) PGE<sub>2</sub> concentration-response curves of EP<sub>4</sub> receptor-mediated cAMP production in the presence or absence of THG213.29 (100  $\mu$ M) assessed by BRET in living HEK293E cells co-transfected with Epac biosensor and EP<sub>4</sub>. Data from one representative experiment of four (each performed in triplicate) are shown. (B) Effect of THG213.29 on cAMP production assessed by Epac-based BRET assay. HEK293E cells co-transfected with Epac sensor and either EP<sub>4</sub>, EP<sub>2</sub> or vasopressin type 2 (V2R) receptors were pre-treated (10 min) or not with THG213.29 (100  $\mu$ M) and stimulated with PGE<sub>2</sub> or AVP (0.1  $\mu$ M). Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 3-6 experiments, each performed in triplicate; \*\*\* $P$  < 0.001). (C) BRET assay to monitor EP<sub>4</sub>-mediated G $\alpha_{i1}$  activation was performed in living HEK293E cells co-transfected with G $\alpha_{i1}$ -Rluc, YFP-G $\beta_1$ , G $\gamma_2$  and EP<sub>4</sub>. Variation of the BRET signal compared to basal conditions was measured in cells pre-treated (10 min) or not with THG213.29 (100  $\mu$ M) or EP<sub>4</sub> antagonist GW627368X (1  $\mu$ M) and stimulated or not with PGE<sub>2</sub> (0.1  $\mu$ M). Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 experiments, each performed in triplicate. (D)  $\beta$ -arrestin recruitment to EP<sub>4</sub> receptor was monitored by BRET in living HEK293E cells co-expressing EP<sub>4</sub>-YFP and Rluc- $\beta$ -arrestin 2. Ligand-promoted BRET variation was measured in cells pre-treated (10 min) or not with THG213.29 (100  $\mu$ M) or EP<sub>4</sub> antagonist GW627368X (1  $\mu$ M) and stimulated or not with PGE<sub>2</sub> (0.1  $\mu$ M). Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 4 experiments, each performed in triplicate.

**Figure 1**

**Figure 2**

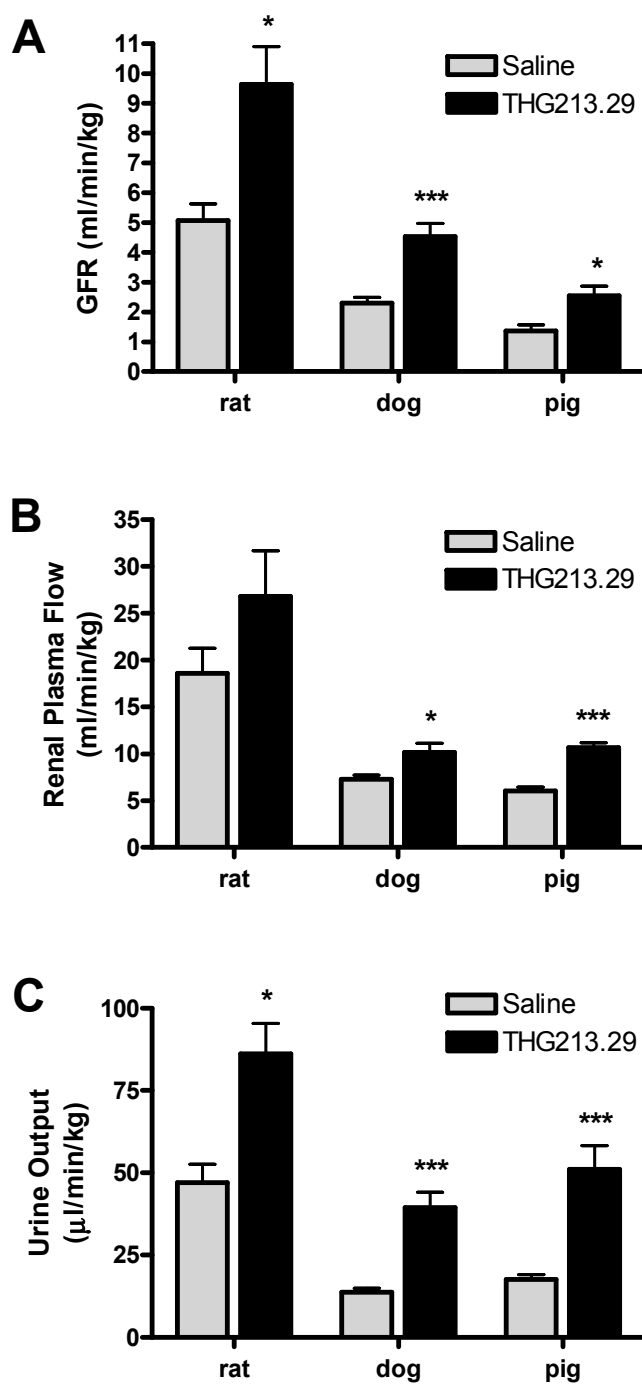
**Figure 3**

Figure 4

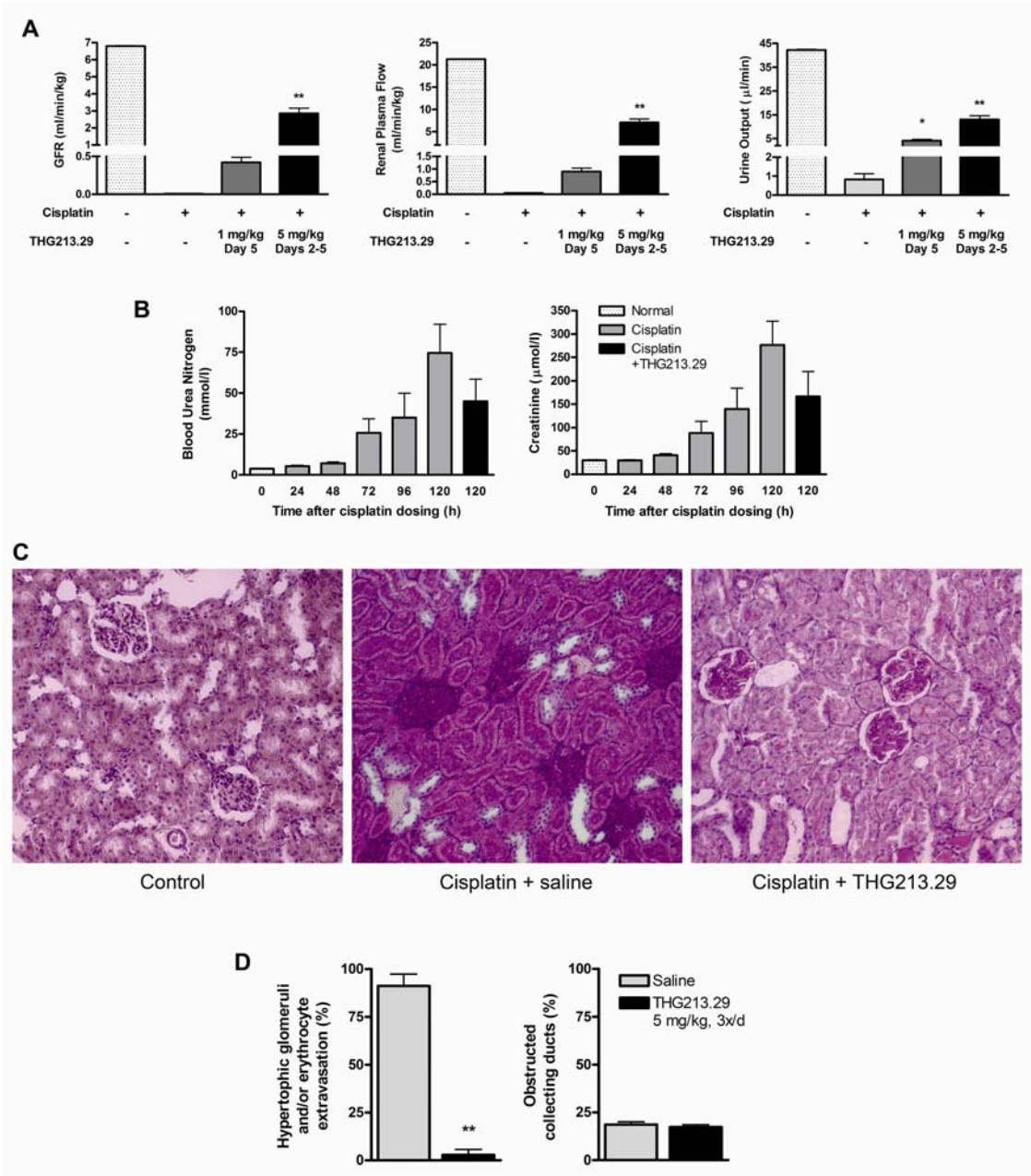


Figure 5

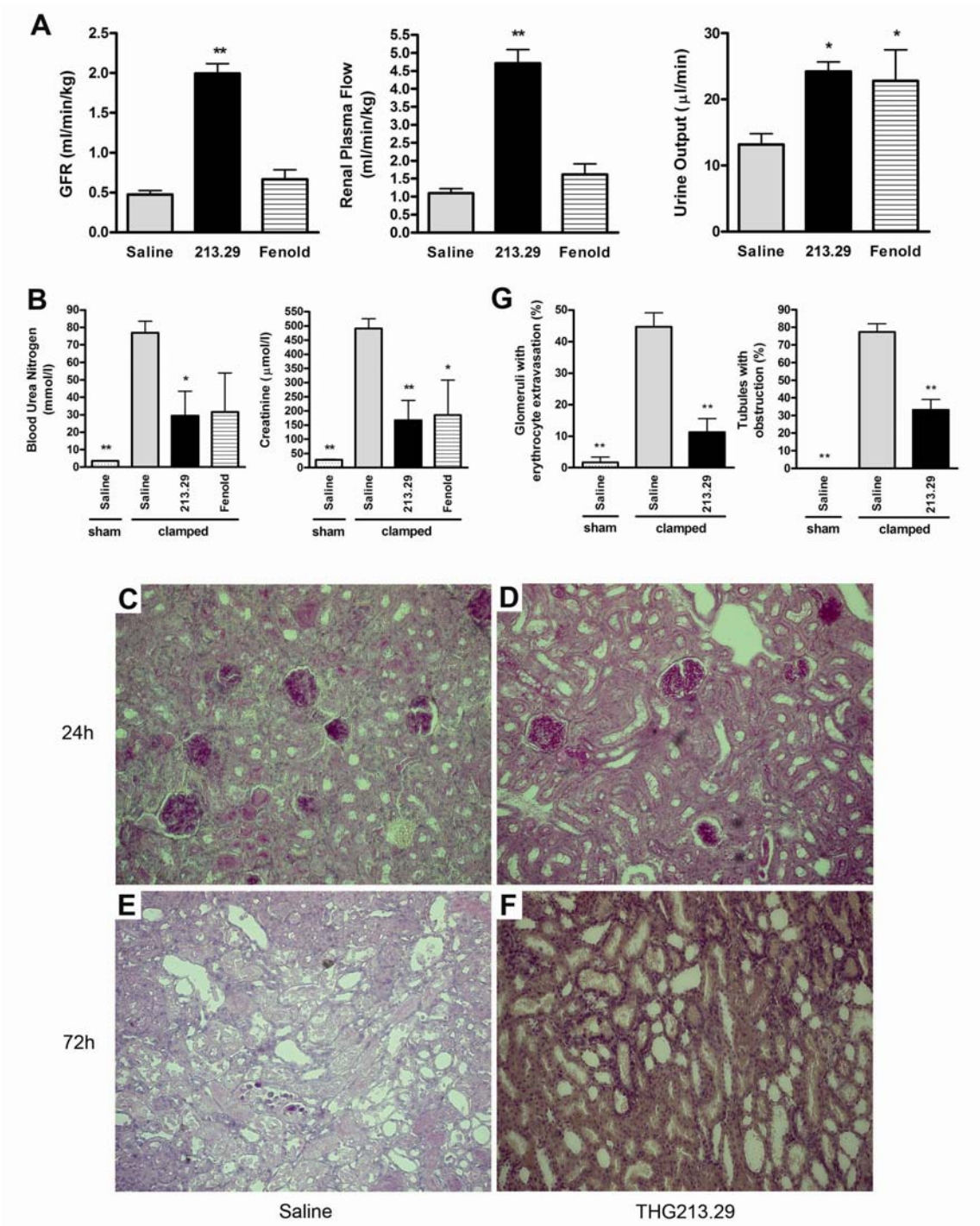




Figure 6

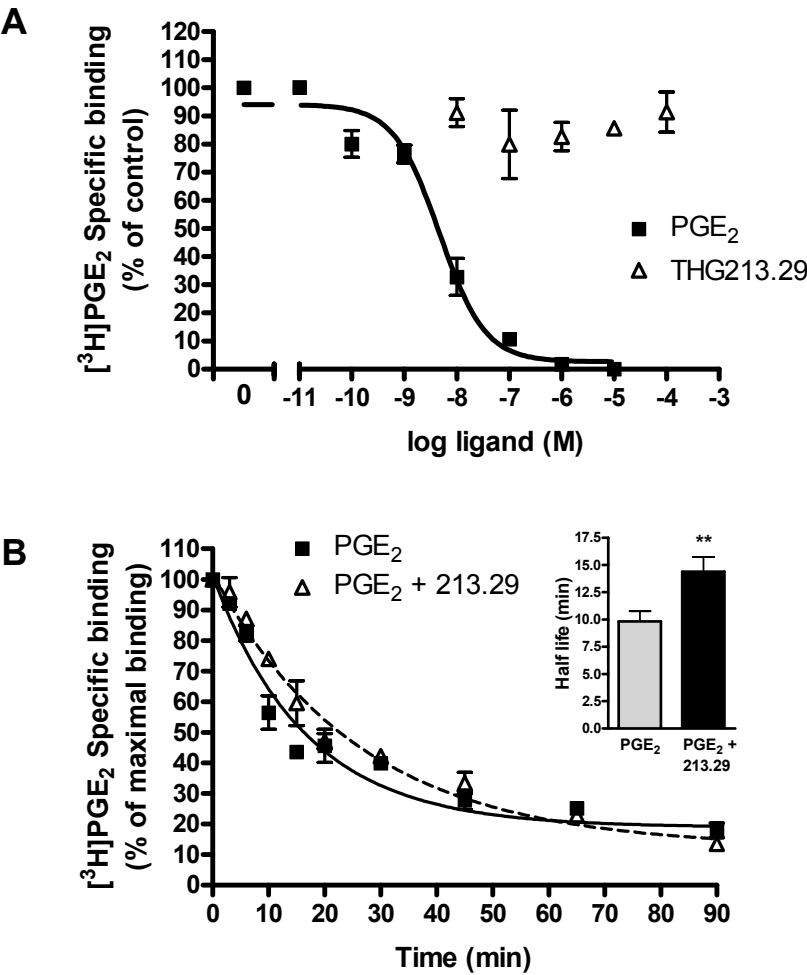
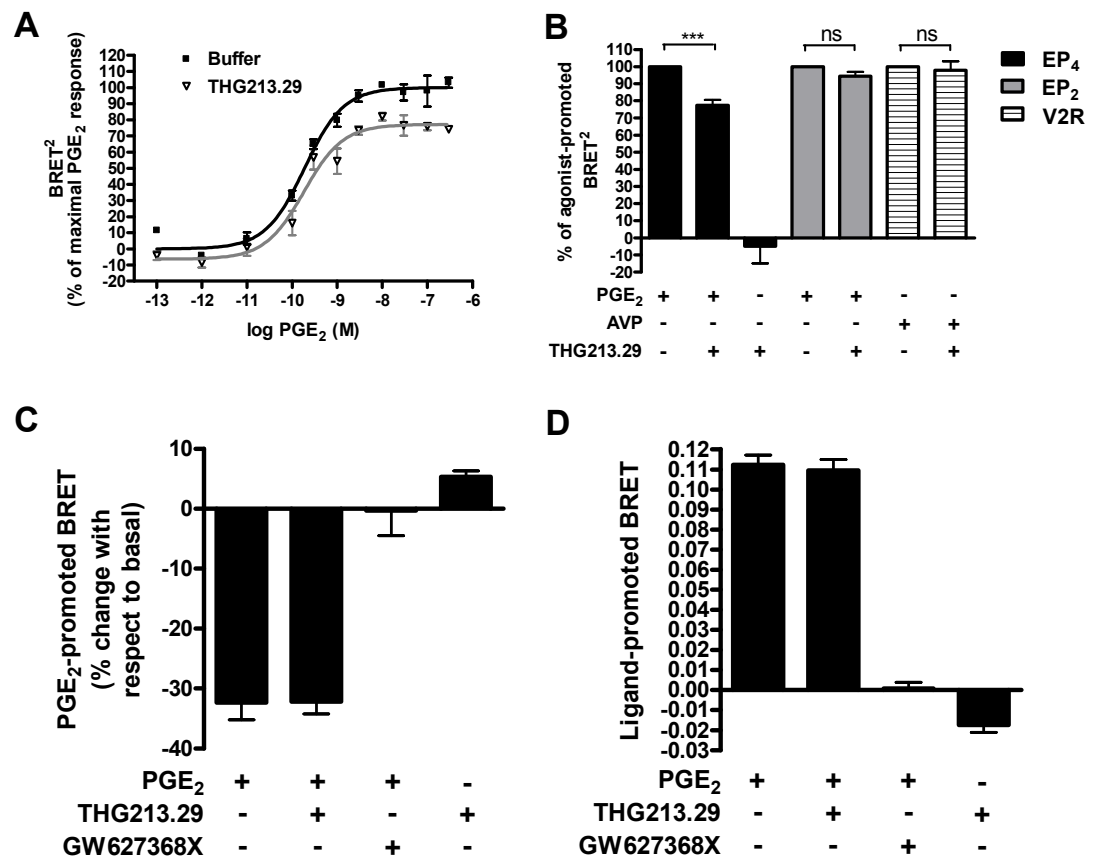


Figure 7



## DISCUSSION

Les RCPG sont une des classes de protéines parmi les plus importantes du génome humain, non seulement de par leur nombre imposant et leur très grande diversité moléculaire (voir Fig. 1), mais aussi dû au fait qu'ils constituent une cible pharmacologique majeure. Leur mode de fonctionnement a d'abord été perçu de façon simpliste comme un équilibre entre modes (ou conformations) actif et inactif, tel un interrupteur « marche/arrêt », où un agoniste active la signalisation et un antagoniste peut bloquer cette signalisation en compétitionnant pour le site de liaison du ligand. De plus, la signalisation des RCPG a initialement été décrite comme étant linéaire, considérant qu'un ligand lie un récepteur, ce qui active une protéine G hétérotrimérique et mène à l'activation d'une cascade de signalisation.

Or, au cours des récentes années, l'appréciation de la complexité fonctionnelle de la biologie des RCPG a augmentée de façon spectaculaire et une grande quantité d'études ont remis en question la vision classique de leur signalisation. Ces études ont mené à l'élaboration d'un modèle beaucoup plus complexe, et il est maintenant généralement accepté que les RCPG peuvent adopter des conformations multiples, qu'ils peuvent interagir avec plusieurs différentes protéines pour exercer toute la panoplie de leurs activités, qu'ils peuvent activer des voies de signalisation indépendantes des protéines G et que certains ligands peuvent moduler leurs activités en se liant à des sites distincts du ligand naturel. De plus, il est aussi accepté que différents ligands puissent stabiliser différentes conformations du récepteur auquel ils se lient, résultant en l'activation sélective de voies de signalisation indépendantes.

C'est dans ce contexte que nous avons voulu dans le cadre de cette thèse nous intéresser aux nouveaux aspects pharmacologiques du récepteur de prostaglandine de type EP<sub>4</sub>, qui est une cible thérapeutique potentielle dans plusieurs pathologies. Dans un premier temps, nous avons réévalué les activités de signalisation d'une panoplie de ligands naturels et synthétiques sur trois voies distinctes d'EP<sub>4</sub> à l'aide d'essais BRET effectués dans des cellules vivantes, mettant en évidence une sélectivité fonctionnelle

importante parmi les ligands testés. Dans un deuxième temps, nous avons voulu tirer profit de la sélectivité fonctionnelle en caractérisant un peptide modulateur dérivé d'une région juxtamembranaire d'EP<sub>4</sub> dans des modèles d'insuffisance rénale aiguë induite par une néphrotoxine ou par ischémie.

### **La sélectivité fonctionnelle basée sur différents états actifs du récepteur**

La sélectivité fonctionnelle de ligands de RCPG a été l'objet de plusieurs études au cours de la dernière décennie, et il est important de distinguer l'activation sélective de voies de signalisation qui peut avoir lieu due au contexte cellulaire de la véritable sélectivité fonctionnelle liée au récepteur. En effet, un ligand pourrait activer seulement la voie la plus sensible dans un système moins bien couplé et/ou à faible densité de récepteur, tandis que dans un système présentant un meilleur couplage et/ou une plus grande densité du récepteur, des voies multiples peuvent être activées. Ces observations demeurent compatibles avec un état actif unique du RCPG, contrairement à la véritable sélectivité fonctionnelle basée sur différents états actifs du récepteur (Kenakin, 2007b).

Comme nous l'avons vu dans le premier article de cette thèse, des agonistes d'EP<sub>4</sub> peuvent activer les voies G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> et  $\beta$ -arrestine à différents degrés. Si un récepteur est couplé plus efficacement à un effecteur qu'à un autre, on peut s'attendre à ce qu'un agoniste possède une plus grande puissance et/ou activité intrinsèque pour cet effecteur. Dans l'éventualité où le récepteur EP<sub>4</sub> adopterait un état actif unique, tous les ligands devraient alors causer des variations relatives similaires entre les différentes voies analysées. Or, nos données indiquent que ce n'est pas le cas. En particulier, une inversion dans les ordres de puissance et dans les ordres de réponse maximale a été observée pour certains ligands. Ainsi, la PGE<sub>1</sub> alcool était plus puissante pour recruter la  $\beta$ -arrestine que pour activer la voie G<sub>i</sub>, tandis que les agonistes PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGD<sub>2</sub> et M&B28767 étaient plus puissants pour activer la voie G<sub>i</sub> que pour recruter la  $\beta$ -arrestine (article 1, Figure 4 et Tableau 1). De façon similaire, l'activité intrinsèque du L-902688 pour recruter la  $\beta$ -arrestine était supérieure à son efficacité pour activer les voies G<sub>s</sub> et G<sub>i</sub>, tandis que l'inverse était vrai pour la PGD<sub>2</sub>

(article 1, Figure 6 et Tableau 1). Ces données indiquent que ce n'est pas le récepteur EP<sub>4</sub> qui est lui-même préférentiellement couplé à une voie de signalisation, mais plutôt qu'un agoniste en particulier « dirige » le récepteur vers un couplage avec un effecteur plutôt qu'un autre. De telles observations ne peuvent pas être expliquées par une sélectivité fonctionnelle dépendante du contexte cellulaire, et elles sont incompatibles avec un état actif unique du récepteur (Kenakin, 2007b). Ces inversions dans les ordres de puissance et de réponse maximale sont plutôt indicatrices de l'existence d'états actifs multiples du récepteur induits par les ligands.

### **La redéfinition de l'efficacité**

La sélectivité fonctionnelle a été mise en évidence avec la multiplication des essais fonctionnels qui a permis de détecter et de comparer différentes activités des RCPG induites par un même ligand. Dans certains cas, un même ligand peut activer des voies de signalisation distinctes avec une puissance et une activité intrinsèque différentes. Des efficacités opposées envers différentes voies peuvent même être détectées (tel que détaillé à la section 1.4.3 de l'introduction), bien que ce ne soit pas le cas des ligands testés dans le cadre de cette thèse. Les combinaisons d'efficacité multiples sont donc théoriquement possibles et la classification d'un ligand basée sur la modulation d'une seule activité d'un récepteur ne décrit pas complètement tout son potentiel de signalisation. Par exemple, le récepteur EP<sub>4</sub> a classiquement été associé à une signalisation dépendante de G<sub>s</sub> menant à une augmentation de la production d'AMPc, et les ligands d'EP<sub>4</sub> étaient fonctionnellement définis par rapport à cette voie de signalisation. Au cours des dernières années, la signalisation d'EP<sub>4</sub> s'est révélée beaucoup plus complexe, nécessitant une réévaluation des propriétés de ces ligands. En effet, l'efficacité ne peut plus être définie en se basant uniquement sur un couple ligand-récepteur, mais doit aussi inclure l'effecteur ou l'activité du récepteur. Pour illustrer cette « pluridimensionnalité de l'efficacité », Galandrin et Bouvier ont proposé une représentation Cartésienne dans laquelle chaque dimension représente une voie de signalisation (Galandrin and Bouvier, 2006; Galandrin et al., 2007).

L'efficacité est alors représentée en « n » dimensions et peut être décrites par des coordonnées spatiales.

Puisque l'efficacité dépend de l'essai utilisé pour l'observée, l'utilisation du plus grand nombre d'essais fonctionnels possible permet de mieux caractériser les propriétés pharmacologiques d'un composé et de mieux le classer. Cela peut aussi permettre de détecter des efficacités « cachées », comme par exemple un effet sur l'internalisation du récepteur par un antagoniste. Finalement, l'utilisation de plusieurs essais peut mener à l'identification de propriétés qui s'additionnent pour produire un phénotype thérapeutique, et des liens pourraient alors être faits entre certains profils d'efficacité et certains effets thérapeutiques ou secondaires.

### **Nouvelles technologies pour l'étude des RCPG**

Au cours des récentes années, les compagnies pharmaceutiques ont profité du développement de méthodes de criblage à haut débit pour cribler de grandes banques de molécules en utilisant principalement des essais basés sur une seule voie de signalisation considérée universelle (comme par exemple la génération de seconds messagers tels que l'AMPC ou le calcium) et impliquant généralement la détection d'indicateurs fluorescents, luminescents ou radioactifs (Thomsen et al., 2005). Ces essais offrent l'avantage d'être facilement réalisés, de fournir des réponses robustes et d'être relativement peu coûteux (Kenakin, 2009b); par contre, ils ne permettent pas de détecter toute la texture de la réponse des molécules testées, en particulier dans un contexte de sélectivité fonctionnelle et d'allostérie.

Une approche qui permet de détecter une plus grande diversité de molécules actives lors d'un criblage est l'utilisation d'essais qui mesurent simultanément plusieurs signaux. Par exemple, le marquage de microbilles avec des combinaisons uniques de signatures spectrales fluorescentes et leur couplage à des protéines, anticorps ou acides nucléiques permettent l'analyse simultanée de centaines d'analytes par cytométrie en flux (Krishnan et al., 2009). Un autre exemple d'approche multiplexe est la méthode « BioMAP » (*Biologically Multiplexed Activity Profiling*) qui consiste en l'analyse statistique d'une série de données d'expression de

protéines dans des modèles multiples de maladies inflammatoires (Kunkel et al., 2004).

Des essais réalisés sur des cellules entières et mesurant l'internalisation du récepteur ou le recrutement de la  $\beta$ -arrestine peuvent détecter un spectre plus large d'activités des RCPG que les essais limités à la détection d'un second messenger unique. Ces essais peuvent aussi détecter des comportements particuliers, comme par exemple l'internalisation du récepteur par des antagonistes qui n'activent aucun second messenger. D'autre part, les méthodes de transfert d'énergie de résonance comme le BRET et le FRET permettent de détecter des changements conformationnels du récepteur induits par des ligands (Gether et al., 1995; Ghanouni et al., 2001; Vilardaga et al., 2005) et permettraient donc de détecter l'activité biologique de ligands allostériques ou de ligands orthostériques possédant une sélectivité fonctionnelle. Une autre technologie permettant de détecter des changements conformationnels induits par la liaison de ligands à un RCPG ainsi que les interactions entre RCPG et effecteurs est la résonance plasmonique et de guide d'ondes (*plasmon-waveguide resonance*, PWR) (Tollin et al., 2003). Cette technique spectroscopique basée sur la résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance*, SPR) mesure les variations de résonance résultant de l'excitation d'un corps (comme des RCPG purifiés dans une bicouche lipidique) attaché sur un mince film métallique recouvert d'une couche de silice avec de la lumière p-polarisée et s-polarisée.

Le développement de nouvelles technologies mesurant des changements cellulaires globaux et permettant la détection d'un large spectre d'activités des RCPG dans des cellules vivantes offre un potentiel encore plus élevé de détection d'activités des RCPG. Une de ces technologies récemment mise au point est l'intégration de la redistribution de masse dynamique mesurée par biosenseur optique dans des cellules vivantes. Cette méthode permet de mesurer une réponse cellulaire intégrée résultant de la redistribution dynamique et dirigée de cibles intracellulaires ou d'assemblages moléculaires induits par la liaison du ligand à son récepteur, et le couplage aux différentes protéines G $\alpha$  produit des courbes « signature » possédant une cinétique et

une amplitude caractéristiques (Fang et al., 2007). Une autre de ces nouvelles technologies est la mesure des variations de l'impédance électrique dans des cellules en culture. Ces variations peuvent être causées par des changements de l'environnement local ionique, du nombre de cellules, des contacts entre cellules, ainsi que de la morphologie, du volume et de l'adhérence des cellules (Shiau et al., 2008). L'impédance cellulaire permet donc de transformer des données cellulaires complexes en un tracé cinétique simple qui est caractéristique selon la voie de signalisation activée (Peters and Scott, 2009). Au surplus, les essais de redistribution de masse dynamique et d'impédance offrent l'avantage de pouvoir être réalisés dans des cellules primaires pertinentes à une pathologie, en temps réel et avec un nombre de manipulations limitées. Ces caractéristiques sont similaires aux essais réalisés dans des tissus d'animaux isolés, mais en permettant l'utilisation de cellules humaines et en augmentant la capacité de criblage des composés. Le potentiel de ces essais à contenu élevé de découvrir de nouveaux ligands, incluant les ligands démontrant de la sélectivité fonctionnelle ou ayant des propriétés allostériques, est augmentée par rapport aux essais plus simples. Par contre, la complexité des signaux est aussi augmentée et la réponse du ligand doit ensuite être décodée pour déterminer les voies impliquées et différencier les effets liés au récepteur visé des effets hors cible. L'utilisation d'essais plus simples comme la mesure de la production de seconds messagers, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, l'internalisation du récepteur ou la liaison de radioligands au récepteur est alors requise.

### **Conformations du récepteur induites ou stabilisées par le ligand : mécanismes moléculaires de la sélectivité fonctionnelle**

Les données présentées dans l'article 1 démontrent clairement que divers ligands peuvent mener à l'activation de différents effecteurs liés au récepteur EP<sub>4</sub> de façon indépendante. Tel que détaillé dans la section 1.4.4 de l'introduction, la liaison d'un agoniste entraîne un réarrangement structurel du récepteur, mais la question se pose si cela se fait par une stabilisation de conformations préexistantes ou encore par l'induction de nouvelles conformations. Les deux possibilités sont envisageables.



Les RCPG peuvent être considérés comme étant intrinsèquement désordonnés et capables d'adopter plusieurs conformations isoénergétiques (Frauenfelder et al., 1991; Hilser et al., 2006). Cette notion est à la base d'un modèle théorique qui a été proposé, selon lequel les RCPG existent en tant qu'agrégats de conformations interchangeantes décrits comme des « ensembles » (Onaran and Costa, 1997; Kenakin, 2002). Les ligands peuvent modifier ces ensembles en se liant sélectivement à certaines conformations préférentielles. Ces conformations sont donc stabilisées au dépend d'autres conformations et un changement dans la collection globale des états du récepteur se produit selon le principe de Le Chatelier : lorsqu'un équilibre dynamique est perturbé par un changement des conditions, la position de l'équilibre se déplace pour contrer le changement (Kenakin, 2009b).

Les ligands pourraient aussi induire de nouvelles conformations. À l'état basal, les domaines TM sont maintenus dans une conformation inactive par les boucles intercalaires et surtout par des interactions non-covalentes entre les chaînes latérales. La liaison d'un agoniste au récepteur mène à la formations d'interactions entre des substituants chimiques du ligand et des résidus spécifiques du récepteur et conduit aussi à la déstabilisation du réseau d'interactions intramoléculaires qui stabilisait l'état basal et à la création d'un nouveau réseau d'interactions intramoléculaires favorisant une conformation active du récepteur (Kobilka and Deupi, 2007). Parmi ces interactions, une collection de molécules d'eau participant à un réseau de liens hydrogènes incluant plusieurs acides aminés hautement conservés dans la famille de récepteurs R (rhodopsine) s'étend du domaine de liaison du ligand à la face intracellulaire du récepteur, et il a été proposé que ce réseau serait impliqué dans la propagation des changements conformationnels activateurs dans la rhodopsine et autres RCPG de cette famille (Li et al., 2004; Pardo et al., 2007).

La liaison de ligands structurellement différents ou de modulateurs allostériques pourrait engendrer la déstabilisation et la création de nouvelles combinaisons de ces interactions intramoléculaires et/ou stabiliser certaines conformations parmi l'ensemble des états du récepteur. Le résultat net est que différents ligands peuvent produire des conformations distinctes du récepteur, et que

ce procédé complexe se fait par une série d'intermédiaires conformationnels tel que suggéré par plusieurs études fonctionnelles, biophysiques et de modélisation moléculaire (Ghanouni et al., 2001; Alves et al., 2003; Liapakis et al., 2004; Swaminath et al., 2005; Bhattacharya and Vaidehi, 2010). Ces conformations sont transmises grâce à la nature allostérique des RCPG vers les domaines intracellulaires qui peuvent ensuite interagir préférentiellement avec diverses protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation et la régulation du récepteur, telles que les différentes protéines G et  $\beta$ -arrestines.

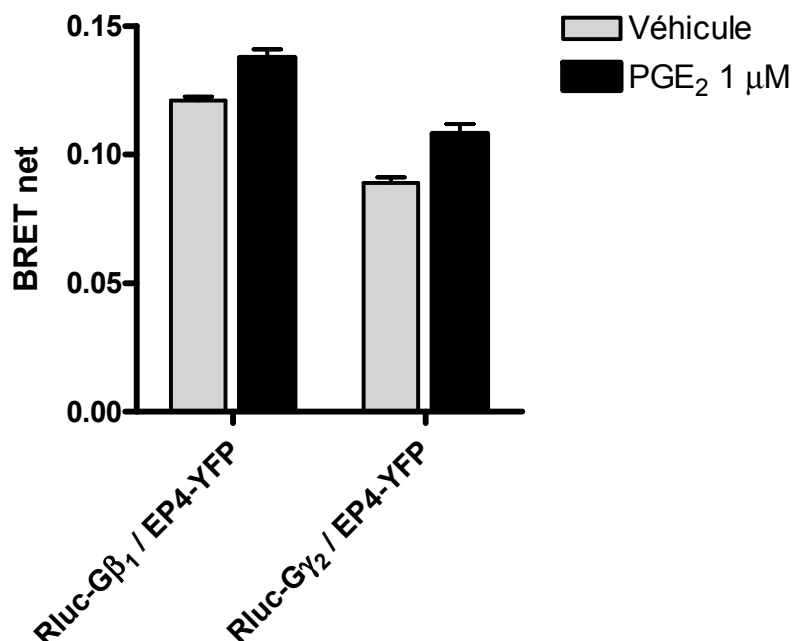
### **Complexes signalétiques préformés**

Le modèle classique de mosaïque fluide (Singer and Nicolson, 1972) selon lequel les récepteurs diffusent librement dans la membrane plasmique et viennent en contact au hasard avec leurs effecteurs membranaires ou cytosoliques est difficilement compatible avec le fait que les RCPG transmettent leurs signaux de façon spécifique, efficace et rapide. Un concept plus conciliable avec ces propriétés signalétiques est celui des complexes de signalisation ou « signalosomes » qui a été mis en évidence par différentes études au cours des récentes années. En effet, plusieurs études utilisant le BRET ont permis de détecter des interactions constitutives entre différents RCPG et des protéines G hétérotrimériques (Galés et al., 2005; Dupre et al., 2006; Galés et al., 2006; Ayoub et al., 2007; Audet et al., 2008). Il a été démontré pour le récepteur  $\beta_2$  adrénergique que ces complexes sont formés avant leur transport vers la membrane plasmique puisque le récepteur et  $\beta\gamma$  s'associent dans le réticulum endoplasmique, suite à quoi les sous-unités  $\alpha$  sont ajoutés au complexe lors du transit réticulum endoplasmique-appareil de Golgi (Dupre et al., 2006). De plus, l'activation du récepteur entraîne un réarrangement structural à l'intérieur du complexe récepteur-protéine G sans en affecter l'intégrité (Galés et al., 2006; Audet et al., 2008). Des associations stables ont aussi été détectées par BRET et co-immunoprécipitation entre le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, des protéines G hétérotrimériques et des effecteurs comme l'AC II et des sous-unités de canaux potassiques Kir3 (Lavigne et al., 2002; Rebois et al., 2006; Dupre et al.,

2007). Tout comme pour les complexes RCPG-protéines G, ces complexes sont formés préalablement à leur arrivée à la membrane plasmique et l'activation du récepteur entraîne des changements conformationnels à l'intérieur du signalosome plutôt qu'une modification de son intégrité.

L'étude de l'interaction entre le récepteur EP<sub>4</sub> et la protéine G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  a aussi été abordée dans le cadre des travaux réalisés pour cette thèse. Une interaction constitutive a ainsi été détectée par BRET entre G $\alpha_{i1}$ -Rluc et YFP-G $\beta_1$ ; le signal BRET mesuré à l'état basal était ensuite modulé à la baisse suite à l'activation d'EP<sub>4</sub> par la PGE<sub>2</sub> (Figure 2, article 1). De plus, une interaction constitutive a aussi été détectée à l'état basal entre EP<sub>4</sub>-YFP et Rluc-G $\beta_1$  ou Rluc-G $\gamma_2$ , et le signal BRET augmentait suite à l'activation du récepteur par la PGE<sub>2</sub> (Figure 15). Ces résultats indiquent donc la présence de complexes signalétiques EP<sub>4</sub>-G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  préformés.

Il est important de considérer qu'une variation de signal BRET peut résulter d'une différence dans la quantité de molécules donneur-accepteur qui interagissent ou encore d'une modification de la distance et/ou de l'orientation entre donneur et accepteur suite à un changement conformationnel. La baisse de signal BRET entre G $\alpha_{i1}$ -Rluc et YFP-G $\beta_1$  et la hausse du signal BRET entre EP<sub>4</sub>-YFP et Rluc-G $\beta_1/\gamma_2$  suite à l'activation d'EP<sub>4</sub> pourrait donc être due à une dissociation de  $\alpha_{i1}$  du dimère  $\beta\gamma$  et à une association de ce dernier au récepteur. Cependant, les résultats obtenus par Galés et al. (2006) suggèrent très fortement que ces variations de signaux BRET correspondent plutôt à un réarrangement structural de la protéine G hétérotrimérique menant à son activation. En effet, les auteurs de cette étude ont inséré une sonde Rluc à trois positions distinctes de G $\alpha_{i1}$ ; la stimulation du récepteur  $\alpha_{2A}$  adrénergique menait à des augmentations ou diminutions du signal BRET entre G $\alpha_{i1}$ -Rluc et le récepteur ou G $\gamma_2$  fusionnés à la GFP selon la position de la sonde Rluc, indiquant qu'il ne s'agissait pas de recrutements ou dissociations mais plutôt de changements conformationnels à l'intérieur d'un complexe préformé.



**Figure 15. Interactions entre EP<sub>4</sub> et Gα<sub>s</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> mesurées par BRET.**

Le BRET net a été mesuré (tel que décrit dans la section « Materials and Methods » de l'article 1) dans des cellules HEK293E vivantes cotransfectées avec EP<sub>4</sub>-YFP, Gα<sub>s</sub> et soit Rluc-Gβ<sub>1</sub> et Gγ<sub>2</sub> ou Rluc-Gγ<sub>2</sub> et Gβ<sub>1</sub>, en présence ou en absence de PGE<sub>2</sub>. Les résultats d'une expérience représentative réalisée en triplicata sont montrés (n=3).

Il est probable que des complexes signalétiques incluant différentes combinaisons de protéines Gαβγ et des effecteurs tel que l'AC soient aussi formés avec EP<sub>4</sub>, de façon similaire aux signalosomes décrits ci-haut pour le récepteur β<sub>2</sub>-adrénergique. Comme il a été démontré par co-immunoprécipitation qu'EP<sub>4</sub> peut former des complexes avec EPRAP/NF-κB1 p105 (Takayama et al., 2006; Minami et al., 2008) ou avec la sous-unité catalytique PS-1 de la γ-sécrétase (Hoshino et al., 2009), il est envisageable que ces protéines soient aussi pré-assemblées à l'intérieur d'un signalosome comprenant EP<sub>4</sub>. La présence de toutes ces protéines pré-

assemblées avec un même récepteur pose cependant un problème d'encombrement stérique et de spécificité du signal, et on peut donc supposer que des complexes signalétiques de différentes compositions coexistent dans une même cellule. Aussi, selon les profils d'expression spatio-temporels des différentes sous-unités des protéines G et des différents effecteurs d'un tissu cellulaire à l'autre, la composition et la variété des complexes de signalisation dépend probablement du type cellulaire et du contexte physiologique.

Puisque les RCPG sont des protéines allostériques, l'interaction constitutive du récepteur avec d'autres protéines à l'intérieur d'un complexe impose probablement des restrictions structurelles au récepteur, résultant en la stabilisation de certaines conformations. Les conformations stabilisées pourraient varier selon la composition du signalosome, et une sélectivité fonctionnelle pourrait alors être obtenue par des agonistes qui lient et activent préférentiellement une conformation stabilisée par un complexe spécifique parmi l'ensemble des différents complexes (Pineyro, 2009).

### **Séparation des effets thérapeutiques et indésirables**

Les composés cliniquement actifs sont généralement considérés comme des inhibiteurs ou activateurs spécifiques pour un sous-type de récepteur donné, et les qualités recherchées d'une drogue sont alors une grande sélectivité et une puissance élevée (Bosier and Hermans, 2007). La découverte au cours des dernières années que des composés peuvent avoir des effets sélectifs sur les différentes activités de signalisation et de régulation d'un même récepteur a cependant un impact sur le développement de nouveaux médicaments. En effet, la possibilité d'activer ou d'inhiber sélectivement certaines voies de signalisation sans affecter les autres activités d'un récepteur pourrait permettre un degré accru de sélectivité et offrir des avantages thérapeutiques. Bien qu'il soit difficile de prédire si la stabilisation de conformations spécifiques d'un récepteur par un ligand soit cliniquement utile, il est envisageable de croire qu'il serait bénéfique de moduler une voie pertinente à une

pathologie sans affecter d'autres voies qui pourraient engendrer des effets indésirables, séparant ainsi les effets thérapeutiques et secondaires d'un récepteur.

Un exemple de cette séparation souhaitable des effets thérapeutiques et secondaires est fourni par le récepteur d'histamine  $H_1$ . La stimulation de ce récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et dans une moindre mesure de l'adénylate cyclase (AC) (Moniri et al., 2004). La voie PLC induit une réponse allergique et de l'hyperalgésie, tandis que la signalisation de l'AC a un effet modulateur sur les fonctions psychiatriques via la régulation des catécholamines. Il pourrait donc être avantageux de développer des ligands capables d'activer sélectivement la voie de l'AC pour obtenir des agents psychoactifs ne possédant pas d'effets secondaires associés à la signalisation de la PLC tels que la bronchoconstriction, l'œdème et l'hypotension. Un autre exemple est celui de l'hormone parathyroïde (PTH) qui est utilisée pour le traitement de l'ostéoporose, mais dont l'utilisation clinique est compliquée due au fait que l'activation du récepteur PTH1R par la PTH stimule à la fois la formation et la résorption osseuse. L'utilisation chez les souris de l'agoniste PTH-betaarr activant sélectivement la signalisation dépendante de la  $\beta$ -arrestine mais pas la signalisation classique dépendante des protéines G mène à une augmentation de la formation des os spongieux sans augmentation simultanée de la résorption osseuse (Gesty-Palmer et al., 2009), suggérant que ce type de ligand pourrait être plus efficace pour le traitement de l'ostéoporose.

Les effets potentiellement thérapeutiques de composés affichant une sélectivité fonctionnelle ne se limitent pas à l'activation préférentielle d'une protéine  $G\alpha$  par rapport à d'autres ou de l'activation sélective de la signalisation dépendante de l'arrestine. En effet, la possibilité de dissocier l'activation des voies de signalisation d'un récepteur de sa désensibilisation et de son internalisation pourrait aussi être avantageuse. Par exemple, les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 sont des corécepteurs pour l'entrée du VIH; il pourrait être utile d'induire sélectivement leur internalisation pour prévenir l'infection par le VIH et empêcher l'apparition de variants résistants du VIH résultant de la pression thérapeutique

associée à l'utilisation de composés bloquant simplement ces récepteurs (Kenakin, 2002).

D'autre part, il est possible que les propriétés atypiques de certaines drogues présentement utilisées en clinique soient attribuables à leur sélectivité fonctionnelle. Ainsi, l'aripiprazole est un antipsychotique utilisé en clinique pour le traitement de la schizophrénie qui agit sur le récepteur de dopamine D<sub>2</sub> et possède très peu d'effets secondaires. La caractérisation de ses effets *in vitro* a mis en évidence un agonisme partiel pour l'activation des MAPK, le relâchement d'acide arachidonique et l'inhibition de l'adénylate cyclase, mais sa puissance pour la voie MAPK est 100 fois inférieure à celle des deux autres voies examinées (Urban et al., 2007b); aussi, l'aripiprazole ne cause pas l'internalisation du récepteur D<sub>2</sub>, contrairement aux agonistes typiques de ce récepteur, et il antagonise l'activation des canaux potassiques Kir3 induite par le récepteur D<sub>2</sub>. Il est donc proposé que ces propriétés uniques expliquent l'efficacité thérapeutique de cette drogue par rapport à d'autres agonistes partiels du récepteur D<sub>2</sub> tel que le (-)3PPP (Mailman, 2007).

### **Détermination des voies de signalisation « pertinentes »**

Le ciblage sélectif du « bon » (cliniquement pertinent) sous-ensemble du répertoire d'activités d'un récepteur représente un défi car il demande une très bonne connaissance des mécanismes moléculaires causant la pathologie. Il ne faut pas se contenter d'identifier un récepteur comme cible thérapeutique, mais aussi accumuler le plus d'information possible afin de déterminer la ou les voies de signalisation et/ou le mécanisme de régulation qui sont pertinents dans la maladie et aussi lesquelles causent des effets secondaires indésirables. La connaissance des mécanismes impliqués dans une pathologie permettrait l'utilisation des essais appropriés pour détecter des composés ayant le profil de sélectivité fonctionnelle recherché. Une approche pouvant contribuer à l'identification des voies de signalisation thérapeutiquement pertinentes d'un récepteur serait l'utilisation de ligands avec différents profils de sélectivité fonctionnelle bien caractérisés *in vitro* dans des modèles animaux.

### **Modulation thérapeutique des activités d'EP<sub>4</sub>**

Comme nous l'avons déjà détaillé à la section 2.3.1 de l'introduction, le récepteur EP<sub>4</sub> est une cible pharmacologique potentielle dans plusieurs pathologies, et selon le contexte, la stimulation ou l'inhibition d'EP<sub>4</sub> pourrait s'avérer bénéfique. En particulier, dans les pathologies où l'atténuation de la signalisation d'EP<sub>4</sub> est souhaitable, l'inhibition spécifique d'EP<sub>4</sub> aurait comme avantage d'éviter les effets indésirables associés à l'utilisation actuelle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (toxicité gastro-intestinale, risques cardiovasculaires) et des inhibiteurs spécifiques de COX-2 (risques cardiovasculaires) (Blouin et al., 2010). L'activation ou le blocage sélectif de certaines voies de signalisation d'EP<sub>4</sub> pourrait s'avérer supérieur à l'activation ou l'inhibition complète des activités du récepteur en offrant un degré de sélectivité supérieur.

Dans les cas où une activation d'EP<sub>4</sub> serait souhaitable, l'utilisation thérapeutique de la PGE<sub>2</sub> entraîne plusieurs effets secondaires indésirables, comme la diarrhée, la léthargie et des contractions utérines, et l'utilisation de l'agoniste spécifique à EP<sub>4</sub> ONO-4819 cause de la diarrhée, de l'hypotension et un épaississement de l'épithélium intestinal chez les rongeurs (Yoshida et al., 2002; Vukicevic et al., 2006). L'activation sélective de certaines voies de signalisation d'EP<sub>4</sub> pourrait possiblement permettre d'éviter ou de réduire ces effets indésirables.

L'inhibition sélective d'activités spécifiques d'EP<sub>4</sub> pourrait aussi être bénéfique dans certains cas. Par exemple, EP<sub>4</sub> induit la production de peptides  $\beta$ -amyloïde indépendamment de son activité sur l'adénylate cyclase mais de façon dépendante de la co-internalisation avec la  $\gamma$ -sécrétase (Hoshino et al., 2009). L'inhibition spécifique de l'internalisation du récepteur ou de son interaction avec la  $\gamma$ -sécrétase pourrait donc être utile dans une thérapie contre la maladie d'Alzheimer, tout en préservant les autres activités normales du récepteur. De façon similaire, l'inhibition spécifique de la formation du complexe de signalisation EP<sub>4</sub>/ $\beta$ -arrestine 1/c-Src responsable de l'augmentation de la migration et du potentiel métastatique de cellules de carcinome colorectal (Buchanan et al., 2006) pourrait être utile dans des



traitements contre le cancer du colon tout en préservant possiblement les fonctions bénéfiques du récepteur, comme le maintien de l'homéostasie intestinale (Kabashima et al., 2002) et de la formation osseuse (Yoshida et al., 2002).

### **Sélectivité fonctionnelle de ligands d'EP<sub>4</sub>**

Certains ligands identifiés dans notre étude, tels que la 16,16-diméthyl PGE<sub>2</sub> et la PGE<sub>1</sub> alcool, activent préférentiellement (par rapport au ligand naturel PGE<sub>2</sub>) les voies non-classiques Gα<sub>i</sub> ou β-arrestine. L'utilisation de ces ligands dans des expériences *in vitro* visant à décoder le rôle biologique d'EP<sub>4</sub> demande donc de tenir compte de ces propriétés de sélectivité fonctionnelle. Par contre, dans un contexte plus complexe, tel que retrouvé dans des tissus animaux, l'interprétation de l'effet de ces ligands est plus difficile, principalement dû à leur pauvre degré de sélectivité pour les différents types de récepteurs de prostaglandines qui peuvent être co-exprimés dans des tissus endogènes. Il est à noter cependant que la sélectivité de ces composés est basée sur leur affinité pour les différents récepteurs de prostaglandines, déterminée par des techniques de liaison de radioligands hétérologues aux récepteurs (voir Tableau 2). La capacité de ces ligands d'activer sélectivement certaines activités des autres récepteurs de prostaglandine n'a pas encore été vérifiée, et il est possible que des ligands puissent en fait être sélectifs pour certaines fonctionnalités. Par exemple, le carvedilol et le labetalol possèdent tous les deux des affinités relatives équivalentes pour les récepteurs β<sub>1</sub> et β<sub>2</sub> adrénergiques et ont été classiquement décrits comme des composés non sélectifs de ces récepteurs; alors que le labetalol est un agoniste partiel pour la production d'AMPc par ces deux récepteurs, il a récemment été mis en évidence que le carvedilol est un agoniste partiel pour la production d'AMPc par le récepteur β<sub>1</sub> adrénergique, mais un antagoniste neutre de cette même voie pour le récepteur β<sub>2</sub> adrénergique (Galandrin and Bouvier, 2006). Ces résultats démontent l'importance de caractériser la sélectivité d'un composé pour chaque activité engendrée par un récepteur donné.

Ceci dit, le développement de ligands sélectifs pour le récepteur EP<sub>4</sub> et possédant des profils de sélectivité fonctionnelle marquée envers certaines activités

du récepteur pourrait être utile pour décoder le rôle des différentes fonctions du récepteur tout en offrant un potentiel thérapeutique. L'identification de ligands sélectifs est toutefois rendue difficile par la conservation des séquences composant le domaine orthostérique de plusieurs sous-types de récepteurs liant un même ligand naturel, comme c'est le cas des récepteurs EP<sub>1-2-3-4</sub>. Une alternative pour obtenir des propriétés de sélectivité fonctionnelle est de l'induire via des modulateurs allostériques. Ces derniers se lient à des sites distincts du site orthostérique qui n'ont pas évolués pour accommoder un ligand endogène commun, et ont donc le potentiel d'offrir une plus grande sélectivité entre différents sous-types de récepteurs.

### **Modulateurs peptidiques**

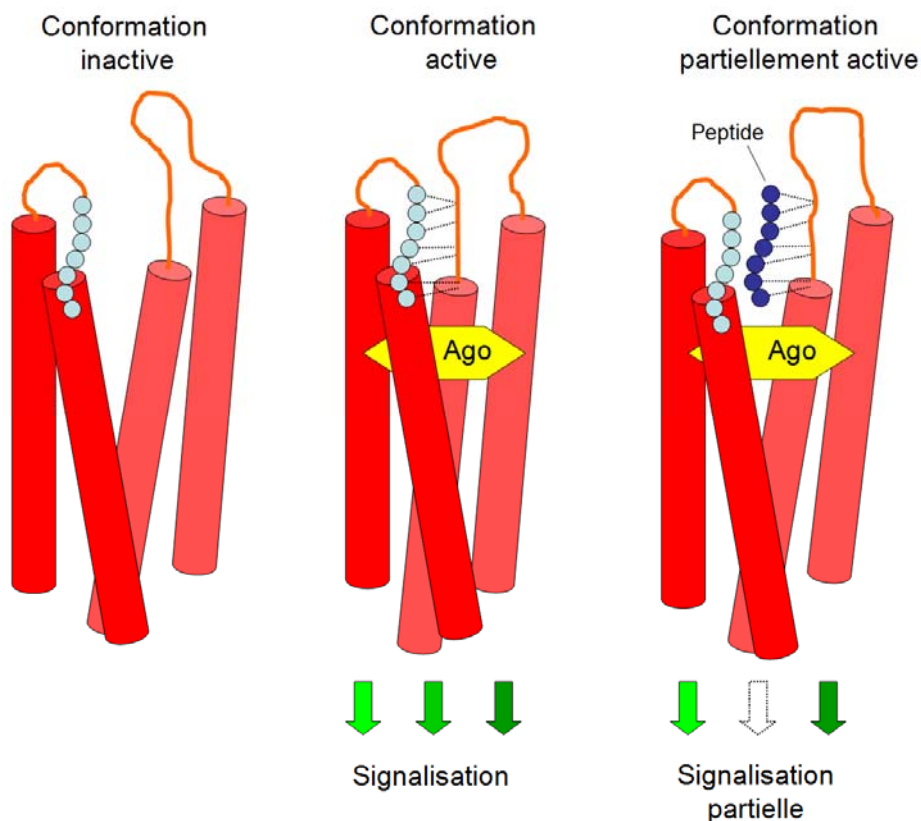
Les modulateurs allostériques ont le potentiel d'induire une sélectivité fonctionnelle indirecte en causant des changements conformationnels du récepteur, modulant ainsi l'affinité et/ou les propriétés signalétiques d'un agoniste orthostérique. Ils offrent aussi l'avantage d'avoir un effet saturable qui dépend de la présence du ligand naturel (May et al., 2007). Bien que plusieurs petites molécules agissant comme modulateurs allostériques de RCPG aient été identifiées (May et al., 2007), le design de ces molécules en absence de la structure tridimensionnelle du récepteur ou leur criblage à partir d'une banque de milliers de composés demeurent ardu. Une alternative intéressante est l'utilisation de peptides dérivés de la séquence du récepteur qui, tel que détaillé à la section 1.4.5.3 de l'introduction, offrent le potentiel de moduler les activités dudit récepteur. En particulier, des peptides dérivés des jonctions juxta-membranaires des RCPG V2R (Rihakova et al., 2009), FP (Peri et al., 2002; Goupil et al., 2010) et EP<sub>4</sub> (article 2 de cette thèse) et aussi de la protéine accessoire du récepteur de type I d'interleukine-1 (Quiniou et al., 2008) ont tous des propriétés de modulation allostérique démontrant une sélectivité fonctionnelle. Il semble donc que la stratégie de dériver de courts peptides des séquences juxta-membranaires de récepteurs pour générer des modulateurs allostériques puisse s'appliquer à plusieurs récepteurs, et il a récemment été proposé de désigner de telles

molécules partageant ces propriétés pharmacologiques des « allostéramères » (Rihakova et al., 2009).

Un modèle du mode d'action potentiel des modulateurs allostériques peptidiques dérivés de jonctions juxta-membranaires de RCPG est illustré à la figure 16. La liaison de l'agoniste naturel au domaine orthostérique impose des contraintes structurales et des microconformations locales au niveau des domaines TM et des boucles extracellulaires. Ce changement conformationnel est transmis à la portion intracellulaire du récepteur qui peut interagir avec différents effecteurs, engendrant la totalité des activités de signalisation du récepteur. L'ajout du peptide modulateur mène à son insertion dans la région juxtamembranaire où la boucle correspondante (qui est flexible) se plie habituellement pour générer un nouveau réseau d'interactions intramoléculaires suite à la liaison de l'agoniste naturel. Ce dernier peut toujours se lier au récepteur, mais une conformation différente du récepteur résulte de la liaison du peptide, ayant pour conséquence que certaines voies de signalisation peuvent être partiellement ou complètement bloquées ou encore potentialisées.

### **Mécanisme d'action du THG213.29**

Le peptide THG213.29 décrit dans le deuxième article de cette thèse a été identifié et optimisé suite à un criblage limité réalisé en utilisant des essais mesurant des réponses cellulaires complexes : la vasomotricité de la veine saphène et l'augmentation du taux de filtration glomérulaire dans un modèle d'IRA induite par occlusion des artères rénales. Cette approche offre l'avantage de mesurer une réponse résultant de l'intégration de plusieurs voies de signalisation, évitant de biaiser les résultats du criblage envers une voie qui pourrait s'avérer non pertinente pour la condition thérapeutique visée. Cela est d'autant plus vrai dans le cas de l'IRA, une condition médicale complexe ayant souvent des causes multifactorielles et pour laquelle les mécanismes cellulaires impliqués sont encore mal définis (Chatterjee, 2007). Par contre, l'avantage de l'approche de la réponse cellulaire globale est accompagné de l'inconvénient que représente l'identification ultérieure du mécanisme moléculaire précis responsable de l'effet thérapeutique obtenu.



**Figure 16. Mode d'action proposé des modulateurs allostériques peptidiques dérivés de jonctions juxta-membranaires de RCPG.**

Les domaines transmembranaires du RCPG sont représentés par des cylindres rouges, les boucles extracellulaires par des traits oranges, les acides aminés de la séquence du récepteur qui sont copiés pour générer le peptide sont indiqués par des cercles bleus pâles et les acides aminés qui composent le peptide par des cercles bleus foncés; Ago : agoniste. Seuls quatre domaines TM et deux boucles extracellulaires sont représentés pour plus de clarté.

Nos résultats indiquent que THG213.29 est un modulateur négatif de la vasorelaxation induite par EP<sub>4</sub> dans la veine saphène porcine et de la production d'AMPc dans des cellules HEK293E, mais qu'il a un effet neutre sur l'activation de Gα<sub>i</sub> et le recrutement de la β-arrestine 2 dans des cellules HEK293E (article 2); il n'est cependant pas encore connu si ces propriétés sont centrales aux effets bénéfiques du THG213.29 sur les fonctions rénales dans un contexte d'IRA *in vivo*. Il est possible que les propriétés inhibitrices du THG213.29 sur la vasorelaxation puissent contribuer à l'augmentation du taux de filtration glomérulaire via une constriction de l'artériole efférente du glomérule. Il est aussi possible que d'autres activités d'EP<sub>4</sub> que nous n'avons pas examinées ou qui ne sont pas encore caractérisées soient impliquées dans la pathogénèse de l'IRA et modulées par le THG213.29. Par exemple, l'inflammation contribue de façon importante aux dommages cellulaires observés dans des modèles d'IRA induite par ischémie-reperfusion et cisplatine (Bonventre and Weinberg, 2003; Chatterjee, 2007; Yao et al., 2007; Kinsey et al., 2008). EP<sub>4</sub> peut avoir un rôle pro- ou anti-inflammatoire selon le contexte cellulaire (Hata and Breyer, 2004) et plusieurs études réalisées avec différents modèles animaux ont démontré un rôle important d'EP<sub>4</sub> dans des pathologies de nature inflammatoire (Kabashima et al., 2002; McCoy et al., 2002; Kabashima et al., 2003; Lin et al., 2006; Clark et al., 2008; Yao et al., 2009). Il est donc possible que le THG213.29 module les fonctions immunes d'EP<sub>4</sub> dans le cadre de l'IRA, diminuant ainsi les dommages aux reins.

Nous avons caractérisé l'effet du THG213.29 sur les voies signalétiques majeures d'EP<sub>4</sub> dans des systèmes recombinants *in vitro*, et il n'est pas exclu que des profils d'efficacité différents soient obtenus dans un système *in vivo* sous des conditions pathologiques associées à l'IRA. En effet, la nature et le degré de modulation allostérique et de sélectivité fonctionnelle peuvent dépendre de l'environnement cellulaire (Childers et al., 2005; Kenakin and Miller, 2010). Par exemple, les niveaux d'expression des GRK et des β-arrestines peuvent varier selon le type cellulaire, selon le niveau d'inflammation ou sous conditions pathologiques, menant à différents patrons de phosphorylation et de signalisation des récepteurs, ou

changeant leurs propriétés d'internalisation (Kenakin and Miller, 2010). Les variations d'expression ou de ratio d'expression de différentes protéines de signalisation (les différentes sous-unités de protéines G hétérotrimériques, les isoformes d'adénylate cyclase, les régulateurs ou activateurs de signalisation des protéines G, etc.) peuvent aussi imposer des effets sur la sélectivité fonctionnelle dépendant du type et du contexte cellulaire. Il serait donc intéressant de tester l'effet du THG213.29 sur la signalisation d'EP<sub>4</sub> dans des cellules primaires du rein, si possible sous conditions pathologiques, en utilisant par exemple les nouvelles technologies décrites plus haut comme l'impédance électrique ou la redistribution de masse dynamique.

### **Spécificité du THG213.29**

Nos résultats démontrent une spécificité du THG213.29 envers le récepteur EP<sub>4</sub>, puisque : 1) il inhibe la vasodilatation de la veine saphène porcine induite par l'agoniste spécifique d'EP<sub>4</sub> L-902688; 2) il atténue la production d'AMPC dans des cellules HEK293E exprimant le récepteur EP<sub>4</sub> mais pas les récepteurs EP<sub>2</sub> et V2R; 3) il module la cinétique de dissociation de la PGE<sub>2</sub> du récepteur EP<sub>4</sub>. Nous avons tenté de démontrer la liaison directe du THG213.29 à EP<sub>4</sub> en marquant le résidu tyrosine du peptide avec de l'iode <sup>125</sup>I, mais une liaison spécifique n'a pas été détectée dans des cellules HEK293 transfectées de façon stable avec EP<sub>4</sub>. Cette absence de liaison du peptide radio-iodé peut être due à l'incorporation du groupe fonctionnel volumineux qu'est l'iode au résidu tyrosine du peptide (Durr et al., 2007). En effet, une perte d'affinité de liaison similaire est par exemple documentée pour les dérivés iodés des hormones peptidiques vasopressine et oxytocine, empêchant leur utilisation dans des études de radioliation (Flouret et al., 1977). De plus, l'importance du résidu tyrosine dans l'activité du THG213.29 est soulignée par le fait que le remplacement de ce résidu dans le peptide THG213 par une alanine (générant le peptide IFTSAECL) a diminué de 60% sa capacité d'inhiber la vasorelaxation induite par la PGE<sub>2</sub> dans des anneaux de veine saphène porcine (résultats non montrés).

La technologie de la résonance plasmonique et de guide d'ondes mentionnée plus haut pourrait s'avérer utile pour compléter la caractérisation du THG213.29. Cette technique permettrait de détecter des changements conformationnels d'EP<sub>4</sub> induits par la liaison du THG213.29, et démontrerait aussi l'interaction directe entre le récepteur et le peptide. En outre, l'utilisation de souris invalidées pour le gène EP<sub>4</sub> (EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup>, malheureusement non disponibles pour cette étude) permettrait de comparer les effets du THG213.29 sur les fonctions rénales en présence ou en absence d'EP<sub>4</sub>, permettant de démontrer que les effets attribués au THG213.29 résultent de son effet sur EP<sub>4</sub> et ne sont pas dus à son interaction avec une autre cible non-spécifique.

### **Application à d'autres pathologies?**

Les résultats présentés dans le deuxième article de cette thèse démontrent l'efficacité du THG213.29 dans l'amélioration des fonctions rénales dans deux modèles d'IRA. Comme l'utilisation d'agonistes spécifiques aux récepteurs EP<sub>2</sub> et/ou EP<sub>4</sub> empêche la progression de l'insuffisance rénale chronique dans un modèle de néphrectomie 5/6 chez le rat (Vukicevic et al., 2006), il serait intéressant de tester l'efficacité du THG213.29 dans un modèle similaire afin de déterminer son potentiel pour le traitement de l'insuffisance rénale chronique.

EP<sub>4</sub> est impliqué dans plusieurs autres pathologies, et la plupart du temps le mécanisme moléculaire précis est mal défini. L'approche qui a été utilisée pour identifier le THG213.29 pourrait donc s'avérer utile pour identifier d'autres composés ayant des propriétés bénéfiques dans différentes pathologies impliquant le récepteur EP<sub>4</sub>, tel que le cancer, l'arthrite ou l'ostéoporose. Le THG213.29 a été optimisé suite à un criblage partant de sept D-octapeptides dérivés de chacune des jonctions juxtaglomérulaires du récepteur EP<sub>4</sub>; il a été choisi en fonction des résultats obtenus dans des essais de vasomotricité de la veine saphène et selon sa capacité à augmenter le taux de filtration glomérulaire dans un modèle d'IRA induite par occlusion de l'artère rénale. Comme il est probable que différentes activités du récepteur EP<sub>4</sub> soient impliquées selon la pathologie dans laquelle ce récepteur joue un rôle, il serait utile de reprendre le criblage de la banque originale de peptides et de poursuivre

l'optimisation d'un peptide sélectionné dans un essai complexe qui est pertinent à la condition pathologique visée, que ce soit un modèle animal ou encore des cellules primaires sous l'influence de la maladie dans un essai complexe comme la mesure de l'impédance électrique ou de la redistribution de masse dynamique.



## CONCLUSION

Les RCPG transmettent de l'information dans la cellule avec une grande complexité. En utilisant le récepteur EP<sub>4</sub> comme modèle d'étude, nous avons mis en évidence la capacité de différents ligands à stabiliser et/ou induire différentes conformations du récepteur, menant à une activation différentielle de ses différentes voies de signalisation. Notre étude est la première à caractériser de façon systématique la réponse d'une série d'agonistes du récepteur EP<sub>4</sub> envers ses effecteurs Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i</sub> et β-arrestine en utilisant une méthodologie basée sur le BRET qui pourrait s'appliquer à l'étude d'autres récepteurs. Nos résultats démontrent une sélectivité fonctionnelle parmi les ligands évalués. Nous avons ensuite caractérisé un petit peptide rationnellement dérivé d'une région juxtamembranaire du récepteur EP<sub>4</sub>. Le peptide THG213.29 a des propriétés pharmacologiques cohérentes avec celles d'un modulateur allostérique non-compétitif démontrant de la sélectivité fonctionnelle, et il améliore les fonctions rénales dans deux modèles d'insuffisance rénale aigüe chez le rat. Le principe utilisé pour découvrir et cribler le THG213.29 pourrait s'appliquer à d'autres pathologies impliquant le récepteur EP<sub>4</sub> et à d'autres RCPG.

Globalement, nos résultats soulignent l'importance et le grand potentiel des concepts pharmacologiques récents de sélectivité fonctionnelle et de modulation allostérique des RCPG pour le développement de nouveaux médicaments. Une meilleure compréhension de la façon dont les ligands peuvent modifier les comportements des RCPG ainsi que des mécanismes complexes de la signalisation de ces récepteurs permettra la découverte de médicaments plus efficaces et sélectifs.

## RÉFÉRENCES

- Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carriere M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N and Metters KM (2000) The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* **1483**:285-293.
- Ahmed K, Tunaru S and Offermanns S (2009) GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **30**:557-562.
- Alves ID, Salamon Z, Varga E, Yamamura HI, Tollin G and Hruby VJ (2003) Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Biol Chem* **278**:48890-48897.
- An S, Yang J, Xia M and Goetzl EJ (1993) Cloning and expression of the EP2 subtype of human receptors for prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun* **197**:263-270.
- Aoudjit L, Potapov A and Takano T (2006) Prostaglandin E2 promotes cell survival of glomerular epithelial cells via the EP4 receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**:F1534-1542.
- Ariens EJ (1954) Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. I. Problems and theory. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **99**:32-49.
- Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M and Pineyro G (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **283**:15078-15088.
- Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW and Pineyro G (2005) Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J Biol Chem* **280**:7808-7816.

- Audoly L and Breyer RM (1997) Substitution of charged amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 affect ligand binding and signal transduction of the prostaglandin EP3 receptor. *Mol Pharmacol* **51**:61-68.
- Ayoub MA, Maurel D, Binet V, Fink M, Prezeau L, Ansanay H and Pin JP (2007) Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galphai1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Mol Pharmacol* **71**:1329-1340.
- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U and Javitch JA (2001) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* **276**:29171-29177.
- Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren XR, Milligan G and Lefkowitz RJ (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* **280**:8041-8050.
- Bastepe M and Ashby B (1997) The long cytoplasmic carboxyl terminus of the prostaglandin E2 receptor EP4 subtype is essential for agonist-induced desensitization. *Mol Pharmacol* **51**:343-349.
- Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R, Metters KM and Adam M (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* **269**:11873-11877.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR and Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**:261-273.
- Bek M, Nusing R, Kowark P, Henger A, Mundel P and Pavenstadt H (1999) Characterization of prostanoid receptors in podocytes. *J Am Soc Nephrol* **10**:2084-2093.
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL and Palevsky P (2004) Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**:R204-212.

- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* **54**:94-104.
- Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR and Chemtob S (1999) Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem* **274**:15719-15724.
- Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR and Chemtob S (1998) Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15792-15797.
- Bhattacharya S and Vaidehi N (2010) Computational Mapping of the Conformational Transitions in Agonist Selective Pathways of a G-Protein Coupled Receptor. *J Am Chem Soc*.
- Bhowmick N, Narayan P and Puett D (1998) The endothelin subtype A receptor undergoes agonist- and antagonist-mediated internalization in the absence of signaling. *Endocrinology* **139**:3185-3192.
- Blouin M, Han Y, Burch J, Farand J, Mellon C, Gaudreault M, Wrona M, Levesque JF, Denis D, Mathieu MC, Stocco R, Vigneault E, Therien A, Clark P, Rowland S, Xu D, O'Neill G, Ducharme Y and Friesen R (2010) The discovery of 4-{1-[(2,5-dimethyl-4-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-3-thienyl}carbonyl)amin o]cyclopropyl}benzoic acid (MK-2894), a potent and selective prostaglandin E2 subtype 4 receptor antagonist. *J Med Chem* **53**:2227-2238.
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A and Marin P (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* **103**:203-221.
- Bokoch MP, Zou Y, Rasmussen SG, Liu CW, Nygaard R, Rosenbaum DM, Fung JJ, Choi HJ, Thian FS, Kobilka TS, Puglisi JD, Weis WI, Pardo L, Prosser RS, Mueller L and Kobilka BK Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **463**:108-112.

- Bonventre JV and Weinberg JM (2003) Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **14**:2199-2210.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP and Versteeg HH (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1187-1205.
- Bosier B and Hermans E (2007) Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance. *Trends Pharmacol Sci* **28**:438-446.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7297-7301.
- Breyer MD and Breyer RM (2001) G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* **63**:579-605.
- Breyer MD, Davis L, Jacobson HR and Breyer RM (1996) Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *Am J Physiol* **270**:F912-918.
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA and Breyer MD (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:661-690.
- Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM and DuBois RN (2006) Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1492-1497.
- Caron MG, Srinivasan Y, Pitha J, Kocielek K and Lefkowitz RJ (1979) Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **254**:2923-2927.
- Chatterjee PK (2007) Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **376**:1-43.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK and Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**:1258-1265.

- Cherukuri DP, Chen XB, Goulet AC, Young RN, Han Y, Heimark RL, Regan JW, Meuillet E and Nelson MA (2007) The EP4 receptor antagonist, L-161,982, blocks prostaglandin E2-induced signal transduction and cell proliferation in HCA-7 colon cancer cells. *Exp Cell Res* **313**:2969-2979.
- Childers SR, Li X, Xiao R and Eisenach JC (2005) Allosteric modulation of adenosine A1 receptor coupling to G-proteins in brain. *J Neurochem* **93**:715-723.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG and Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**:61-79.
- Clark P, Rowland SE, Denis D, Mathieu MC, Stocco R, Poirier H, Burch J, Han Y, Audoly L, Therien AG and Xu D (2008) MF498 [N-{[4-(5,9-Diethoxy-6-oxo-6,8-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-g]quinolin-7-yl)-3-m ethylbenzyl]sulfonyl}-2-(2-methoxyphenyl)acetamide], a selective E prostanoid receptor 4 antagonist, relieves joint inflammation and pain in rodent models of rheumatoid and osteoarthritis. *J Pharmacol Exp Ther* **325**:425-434.
- Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A and Sheldrick RL (1994a) A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* **47**:151-168.
- Coleman RA, Smith WL and Narumiya S (1994b) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* **46**:205-229.
- Costa T and Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:7321-7325.
- Davis TL and Sharif NA (2000) Pharmacological characterization of [(3)H]-prostaglandin E(2) binding to the cloned human EP(4) prostanoid receptor. *Br J Pharmacol* **130**:1919-1926.
- De Lean A, Stadel JM and Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**:7108-7117.

- de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, Moreno R, Dearden NM, Antonelli M, Takala J, Sprung C and Cantraine F (2000) Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* **26**:915-921.
- DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O and Bunnett NW (2000) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11086-11091.
- Desai S, April H, Nwaneshiudu C and Ashby B (2000) Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol Pharmacol* **58**:1279-1286.
- Desai S and Ashby B (2001) Agonist-induced internalization and mitogen-activated protein kinase activation of the human prostaglandin EP4 receptor. *FEBS Lett* **501**:156-160.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ and Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**:483-510.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ and Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**:75-79.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A and Perros M (2005) Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4721-4732.
- Dupre DJ, Baragli A, Rebois RV, Ethier N and Hebert TE (2007) Signalling complexes associated with adenylyl cyclase II are assembled during their biosynthesis. *Cell Signal* **19**:481-489.

- Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM and Hebert TE (2006) Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J Biol Chem* **281**:34561-34573.
- Durr JA, Blankenship M, Chauhan SS and Pennington MW (2007) Targeted tyrosine iodination in a multi-tyrosine vasopressin analog. *J Pept Sci* **13**:756-761.
- Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **33**:187-194.
- Fang Y, Li G and Ferrie AM (2007) Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* **55**:314-322.
- Farman N, Pradelles P and Bonvalet JP (1987) PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ , 6-keto-PGF<sub>1</sub>  $\alpha$ , and TxB<sub>2</sub> synthesis along the rabbit nephron. *Am J Physiol* **252**:F53-59.
- Flouret G, Terada S, Yang F, Nakagawa SH, Nakahara T and Hechter O (1977) Iodinated neurohypophyseal hormones as potential ligands for receptor binding and intermediates in synthesis of tritiated hormones. *Biochemistry* **16**:2119-2124.
- Foord SM (2002) Receptor classification: post genome. *Curr Opin Pharmacol* **2**:561-566.
- Franceschini N, Joy MS and Kshirsagar A (2003) Cinacalcet HCl: a calcimimetic agent for the management of primary and secondary hyperparathyroidism. *Expert Opin Investig Drugs* **12**:1413-1421.
- Frauenfelder H, Sligar SG and Wolynes PG (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**:1598-1603.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG and Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**:1256-1272.
- Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nusing RM, Skott O and Jensen BL (2005) Prostaglandin E<sub>2</sub> EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptor activation mediates



- cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**:F989-997.
- Fujino H and Regan JW (2006) EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein. *Mol Pharmacol* **69**:5-10.
- Fujino H, Salvi S and Regan JW (2005) Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Mol Pharmacol* **68**:251-259.
- Fujino H, West KA and Regan JW (2002) Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J Biol Chem* **277**:2614-2619.
- Fujino H, Xu W and Regan JW (2003) Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* **278**:12151-12156.
- Fulton AM, Ma X and Kundu N (2006) Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res* **66**:9794-9797.
- Galandrin S and Bouvier M (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* **70**:1575-1584.
- Galandrin S, Oligny-Longpre G and Bouvier M (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **28**:423-430.
- Galés C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**:177-184.
- Galés C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**:778-786.

- Gao ZG and Jacobson KA (2008) Translocation of arrestin induced by human A(3) adenosine receptor ligands in an engineered cell line: comparison with G protein-dependent pathways. *Pharmacol Res* **57**:303-311.
- Gay EA, Urban JD, Nichols DE, Oxford GS and Mailman RB (2004) Functional selectivity of D2 receptor ligands in a Chinese hamster ovary hD2L cell line: evidence for induction of ligand-specific receptor states. *Mol Pharmacol* **66**:97-105.
- Gbahou F, Rouleau A, Morisset S, Parmentier R, Crochet S, Lin JS, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC and Arrang JM (2003) Protean agonism at histamine H3 receptors in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11086-11091.
- Gesty-Palmer D, Flannery P, Yuan L, Corsino L, Spurney R, Lefkowitz RJ and Luttrell LM (2009) A beta-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Sci Transl Med* **1**:1ra1.
- Gether U, Lin S and Kobilka BK (1995) Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J Biol Chem* **270**:28268-28275.
- Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR and Kobilka BK (2001) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* **276**:24433-24436.
- Goodman M and Chorev M (1979) On the Concept of Linear Modified Retro-Peptide Structures. *Acc Chem Res* **12**:1-7.
- Goupil E, Tassy D, Bourguet C, Quiniou C, Wisheart V, Petrin D, Le Gouill C, Devost D, Zingg HH, Bouvier M, Saragovi HU, Chemtob S, Lubell WD, Claing A, Hebert TE and Laporte SA (2010) A Novel Biased Allosteric Compound Inhibitor of Parturition Selectively Impedes the Prostaglandin F2{alpha}-mediated Rho/ROCK Signaling Pathway. *J Biol Chem* **285**:25624-25636.

- Hall DA (2000) Modeling the functional effects of allosteric modulators at pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation. *Mol Pharmacol* **58**:1412-1423.
- Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J and Bouvier M (2005) High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* **10**:463-475.
- Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B and Bouvier M (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**:Unit 5 23.
- Hata AN and Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* **103**:147-166.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C and Bouvier M (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**:16384-16392.
- Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**:25-44.
- Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P and Bonventre JV (2002) Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care* **8**:526-534.
- Hilser VJ, Garcia-Moreno EB, Oas TG, Kapp G and Whitten ST (2006) A statistical thermodynamic model of the protein ensemble. *Chem Rev* **106**:1545-1558.
- Hilton R (2006) Acute renal failure. *BMJ* **333**:786-790.
- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S and Nagata K (2001) Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* **193**:255-261.

- Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, Narumiya S and Ichikawa A (1993) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* **268**:7759-7762.
- Hoshino T, Nakaya T, Homan T, Tanaka K, Sugimoto Y, Araki W, Narita M, Narumiya S, Suzuki T and Mizushima T (2007) Involvement of prostaglandin E2 in production of amyloid-beta peptides both in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **282**:32676-32688.
- Hoshino T, Namba T, Takehara M, Nakaya T, Sugimoto Y, Araki W, Narumiya S, Suzuki T and Mizushima T (2009) Prostaglandin E2 stimulates the production of amyloid-beta peptides through internalization of the EP4 receptor. *J Biol Chem* **284**:18493-18502.
- Hristovska AM, Rasmussen LE, Hansen PB, Nielsen SS, Nusing RM, Narumiya S, Vanhoutte P, Skott O and Jensen BL (2007) Prostaglandin E2 induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* **50**:525-530.
- Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M and Marullo S (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* **277**:34666-34673.
- Ivey KN and Srivastava D (2006) The paradoxical patent ductus arteriosus. *J Clin Invest* **116**:2863-2865.
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP and Stevens RC (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**:1211-1217.
- Jensen BL, Stubbe J, Hansen PB, Andreassen D and Skott O (2001) Localization of prostaglandin E(2) EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**:F1001-1009.
- Jiang LI, Collins J, Davis R, Lin KM, DeCamp D, Roach T, Hsueh R, Rebres RA, Ross EM, Taussig R, Fraser I and Sternweis PC (2007) Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem* **282**:10576-10584.

- Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, Schwartz TW and Elling CE (2007) Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through Galpha(s). *J Pharmacol Exp Ther* **322**:148-154.
- Kabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A and Narumiya S (2002) The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest* **109**:883-893.
- Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K and Narumiya S (2003) Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* **9**:744-749.
- Kellum JA (2008) Acute kidney injury. *Crit Care Med* **36**:S141-145.
- Kellum JA and Angus DC (2002) Patients are dying of acute renal failure. *Crit Care Med* **30**:2156-2157.
- Kenakin T (2002) Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:349-379.
- Kenakin T (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**:346-354.
- Kenakin T (2004) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* **65**:2-11.
- Kenakin T (2005a) New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* **4**:919-927.
- Kenakin T (2005b) The physiological significance of constitutive receptor activity. *Trends Pharmacol Sci* **26**:603-605.
- Kenakin T (2007a) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**:407-415.
- Kenakin T (2007b) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* **72**:1393-1401.
- Kenakin T and Miller LJ (2010) Seven Transmembrane Receptors as Shapeshifting Proteins: The Impact of Allosteric Modulation and Functional Selectivity on New Drug Discovery. *Pharmacol Rev*.

- Kenakin TP (2009a) '7TM receptor allosterity: putting numbers to shapeshifting proteins. *Trends Pharmacol Sci* **30**:460-469.
- Kenakin TP (2009b) Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **8**:617-626.
- Kinsey GR, Li L and Okusa MD (2008) Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* **109**:e102-107.
- Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y and Narumiya S (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* **122**:217-224.
- Klewe IV, Nielsen SM, Tarpo L, Urizar E, Dipace C, Javitch JA, Gether U, Egebjerg J and Christensen KV (2008) Recruitment of beta-arrestin2 to the dopamine D2 receptor: insights into anti-psychotic and anti-parkinsonian drug receptor signaling. *Neuropharmacology* **54**:1215-1222.
- Kobilka BK and Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**:397-406.
- Krishnan VV, Khan IH and Luciw PA (2009) Multiplexed microbead immunoassays by flow cytometry for molecular profiling: Basic concepts and proteomics applications. *Crit Rev Biotechnol* **29**:29-43.
- Kunkel EJ, Dea M, Ebens A, Hytopoulos E, Melrose J, Nguyen D, Ota KS, Plavec I, Wang Y, Watson SR, Butcher EC and Berg EL (2004) An integrative biology approach for analysis of drug action in models of human vascular inflammation. *FASEB J* **18**:1279-1281.
- Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL and Nichols DE (2003) Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A2 signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:229-237.
- Lameire N, Van Biesen W and Vanholder R (2005) Acute renal failure. *Lancet* **365**:417-430.
- Lavigne N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE and Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable

- complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **277**:46010-46019.
- Leach K, Sexton PM and Christopoulos A (2007) Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **28**:382-389.
- Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S and Heveker N (2009) Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **25**:413-422.
- Li J, Edwards PC, Burghammer M, Villa C and Schertler GF (2004) Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* **343**:1409-1438.
- Liapakis G, Chan WC, Papadokostaki M and Javitch JA (2004) Synergistic contributions of the functional groups of epinephrine to its affinity and efficacy at the beta2 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* **65**:1181-1190.
- Limbird LE (2004) The receptor concept: a continuing evolution. *Mol Interv* **4**:326-336.
- Lin CR, Amaya F, Barrett L, Wang H, Takada J, Samad TA and Woolf CJ (2006) Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1096-1103.
- Lin YS, Hsieh M, Lee YJ, Liu KL and Lin TH (2008) AH23848 accelerates inducible nitric oxide synthase degradation through attenuation of cAMP signaling in glomerular mesangial cells. *Nitric Oxide* **18**:93-104.
- Loening AM, Fenn TD, Wu AM and Gambhir SS (2006) Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**:391-400.
- Lote CJ (2000) *Principles of renal physiology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Luttrell LM (2006) Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* **332**:3-49.

- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**:655-661.
- Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**:455-465.
- Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T and Fulton AM (2006) Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res* **66**:2923-2927.
- Maillet EL, Pellegrini N, Valant C, Bucher B, Hibert M, Bourguignon JJ and Galzi JL (2007) A novel, conformation-specific allosteric inhibitor of the tachykinin NK2 receptor (NK2R) with functionally selective properties. *FASEB J* **21**:2124-2134.
- Mailman RB (2007) GPCR functional selectivity has therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci* **28**:390-396.
- Mandell AJ, Selz KA, Owens MJ, Kinkead B, Shlesinger MF, Gutman DA and Arguragi V (2003) Cellular and behavioral effects of D2 dopamine receptor hydrophobic eigenmode-targeted peptide ligands. *Neuropsychopharmacology* **28 Suppl 1**:S98-107.
- Marieb EN (1993) *Anatomie et physiologie humaines*. Éditions du nouveau pédagogique, Montréal, QC.
- Marinissen MJ and Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**:368-376.
- Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR and Caron MG (2008) Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:13656-13661.
- Matthews JC (1993) *Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- May LT, Leach K, Sexton PM and Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:1-51.



- McCoy JM, Wicks JR and Audoly LP (2002) The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **110**:651-658.
- McDonnell JM, Beavil AJ, Mackay GA, Jameson BA, Korngold R, Gould HJ and Sutton BJ (1996) Structure based design and characterization of peptides that inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nat Struct Biol* **3**:419-426.
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG and Levin A (2007) Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* **11**:R31.
- Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S46-55.
- Minami M, Shimizu K, Okamoto Y, Folco E, Ilasaca ML, Feinberg MW, Aikawa M and Libby P (2008) Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF-kappaB1 and attenuates macrophage activation. *J Biol Chem* **283**:9692-9703.
- Moniri NH, Covington-Strachan D and Booth RG (2004) Ligand-directed functional heterogeneity of histamine H1 receptors: novel dual-function ligands selectively activate and block H1-mediated phospholipase C and adenylyl cyclase signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:274-281.
- Monod J, Changeux JP and Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* **6**:306-329.
- Monod J, Wyman J and Changeux JP (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* **12**:88-118.
- Mori K, Tanaka I, Kotani M, Miyaoka F, Sando T, Muro S, Sasaki Y, Nakagawa O, Ogawa Y, Usui T, Ozaki S, Ichikawa A, Narumiya S and Nakao K (1996) Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP4 subtype: differential regulation in monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester. *J Mol Med* **74**:333-336.
- Mukhopadhyay S and Howlett AC (2005) Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions. *Mol Pharmacol* **67**:2016-2024.

- Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T and Wakabayashi K (2002) Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res* **62**:28-32.
- Nagamatsu T, Imai H, Yokoi M, Nishiyama T, Hirasawa Y, Nagao T and Suzuki Y (2006) Protective effect of prostaglandin EP4-receptor agonist on anti-glomerular basement membrane antibody-associated nephritis. *J Pharmacol Sci* **102**:182-188.
- Nash K, Hafeez A and Hou S (2002) Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* **39**:930-936.
- Nestor JJ, Jr. (2009) The medicinal chemistry of peptides. *Curr Med Chem* **16**:4399-4418.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T and Christopoulos A (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **55**:597-606.
- Neuschafer-Rube F, Hermosilla R, Rehwald M, Ronnstrand L, Schulein R, Wernstedt C and Puschel GP (2004) Identification of a Ser/Thr cluster in the C-terminal domain of the human prostaglandin receptor EP4 that is essential for agonist-induced beta-arrestin1 recruitment but differs from the apparent principal phosphorylation site. *Biochem J* **379**:573-585.
- Neuschafer-Rube F, Oppermann M, Moller U, Boer U and Puschel GP (1999) Agonist-induced phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases of the EP4 receptor carboxyl-terminal domain in an EP3/EP4 prostaglandin E(2) receptor hybrid. *Mol Pharmacol* **56**:419-428.
- Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, Anderson PA, Malouf NN and Koller BH (1997) The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* **390**:78-81.

- Nishigaki N, Negishi M, Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Narumiya S and Ichikawa A (1995) Identification of prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells EP4 subtype. *FEBS Lett* **364**:339-341.
- Nishigaki N, Negishi M and Ichikawa A (1996) Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* **50**:1031-1037.
- Nobles M, Benians A and Tinker A (2005) Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18706-18711.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS and Caron MG (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* **274**:32248-32257.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG and Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**:17201-17210.
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* **83**:101-130.
- Okada T, Ernst OP, Palczewski K and Hofmann KP (2001) Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem Sci* **26**:318-324.
- Oldham WM and Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:60-71.
- Omer S, Mulay S, Cernacek P and Varma DR (1995) Attenuation of renal effects of atrial natriuretic factor during rat pregnancy. *Am J Physiol* **268**:F416-422.
- Onaran HO and Costa T (1997) Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Ann N Y Acad Sci* **812**:98-115.
- Overington JP, Al-Lazikani B and Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**:993-996.

- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-745.
- Pappenheimer JR, Karnovsky ML and Maggio JE (1997) Absorption and excretion of undegradable peptides: role of lipid solubility and net charge. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:292-300.
- Pardo L, Deupi X, Dolker N, Lopez-Rodriguez ML and Campillo M (2007) The role of internal water molecules in the structure and function of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors. *Chembiochem* **8**:19-24.
- Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD and Chemtob S (2002) THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* **26**:389-397.
- Perrone RD, Madias NE and Levey AS (1992) Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* **38**:1933-1953.
- Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S and Bouvier M (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *Embo J* **22**:3816-3824.
- Peters MF and Scott CW (2009) Evaluating cellular impedance assays for detection of GPCR pleiotropic signaling and functional selectivity. *J Biomol Screen* **14**:246-255.
- Pineyro G (2009) Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal* **21**:179-185.
- Pozzi A, Yan X, Macias-Perez I, Wei S, Hata AN, Breyer RM, Morrow JD and Capdevila JH (2004) Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* **279**:29797-29804.
- Quiniou C, Sapieha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, Leduc M, Rihakova L, Joyal JS, Nadeau S, Heveker N, Lubell W, Sennlaub F, Gobeil F, Jr.,

- Miller G, Pshezhetsky AV and Chemtob S (2008) Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol* **180**:6977-6987.
- Quirk K, Roberts DJ and Strange PG (2007) Mechanisms of G protein activation via the D2 dopamine receptor: evidence for persistent receptor/G protein interaction after agonist stimulation. *Br J Pharmacol* **151**:144-152.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weiss WI and Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**:383-387.
- Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M and Hebert TE (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* **119**:2807-2818.
- Regan JW (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* **74**:143-153.
- Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF and Gil DW (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* **46**:213-220.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J and Borst P (2003) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9244-9249.
- Reiter E and Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* **17**:159-165.
- Ries F and Klastersky J (1986) Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis* **8**:368-379.
- Rihakova L, Quiniou C, Hamdan F, Kaul R, Brault S, Hou X, Lahaie I, Sapieha PS, Hamel D, Shao Z, Gobeil Jr F, Hardy P, Joyal JS, Nedev H, Duhamel F, Beauregard K, Heveker N, Saragovi HU, Guillon G, Bouvier M, Lubell WD and Chemtob S (2009) VRQ397 (CRAVKY): a novel non-competitive V2 receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.

- Ritter SL and Hall RA (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:819-830.
- Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D and Miller LJ (1997) Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* **51**:357-362.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG and Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**:356-363.
- Ross EM and Gilman AG (1977) Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* **252**:6966-6969.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T and Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**:4625-4636.
- Samoilova M, Wentlandt K, Adamchik Y, Velumian AA and Carlen PL (2008) Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* **210**:762-775.
- Schuster VL (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:633-647.
- Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nusing RM and Kurtz A (2004) Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**:F427-433.
- Selz KA, Mandell AJ, Shlesinger MF, Arcuragi V and Owens MJ (2004) Designing human m1 muscarinic receptor-targeted hydrophobic eigenmode matched peptides as functional modulators. *Biophys J* **86**:1308-1331.
- Shiau AK, Massari ME and Ozbal CC (2008) Back to basics: label-free technologies for small molecule screening. *Comb Chem High Throughput Screen* **11**:231-237.
- Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR and Prather PL (2005) Agonist-directed trafficking of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **315**:828-838.

- Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2008) Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:9988-9993.
- Singer SJ and Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**:720-731.
- Smith WL, Marnett LJ and DeWitt DL (1991) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* **49**:153-179.
- Smyth EM and FitzGerald GA (2007) The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, & related compounds, in *Basic and Clinical Pharmacology* (Katzung BG ed), McGraw Hill Medical, Toronto, Canada.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH and Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365**:170-175.
- Stephenson RP (1956) A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* **11**:379-393.
- Stillman BA, Audoly L and Breyer RM (1998) A conserved threonine in the second extracellular loop of the human EP2 and EP4 receptors is required for ligand binding. *Eur J Pharmacol* **357**:73-82.
- Stitham J, Stojanovic A, Merenick BL, O'Hara KA and Hwa J (2003) The unique ligand-binding pocket for the human prostacyclin receptor. Site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J Biol Chem* **278**:4250-4257.
- Sugimoto Y and Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* **282**:11613-11617.
- Sutherland EW (1971) Introduction, in *Cyclic AMP* (Robinson GA, Butcher RW and Sutherland EW eds) pp 5-13, Academic Press, New York.
- Swaminath G, Deupi X, Lee TW, Zhu W, Thian FS, Kobilka TS and Kobilka B (2005) Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J Biol Chem* **280**:22165-22171.

- Takayama K, Sukhova GK, Chin MT and Libby P (2006) A novel prostaglandin E receptor 4-associated protein participates in antiinflammatory signaling. *Circ Res* **98**:499-504.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**:30-34.
- Thadhani R, Pascual M and Bonventre JV (1996) Acute renal failure. *N Engl J Med* **334**:1448-1460.
- Thomsen W, Frazer J and Unett D (2005) Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol* **16**:655-665.
- Tilley SL, Coffman TM and Koller BH (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* **108**:15-23.
- Timoshenko AV, Lala PK and Chakraborty C (2004) PGE2-mediated upregulation of iNOS in murine breast cancer cells through the activation of EP4 receptors. *Int J Cancer* **108**:384-389.
- Tollin G, Salamon Z and Hruby VJ (2003) Techniques: plasmon-waveguide resonance (PWR) spectroscopy as a tool to study ligand-GPCR interactions. *Trends Pharmacol Sci* **24**:655-659.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M and Mailman RB (2007a) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:1-13.
- Urban JD, Vargas GA, von Zastrow M and Mailman RB (2007b) Aripiprazole has functionally selective actions at dopamine D2 receptor-mediated signaling pathways. *Neuropsychopharmacology* **32**:67-77.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE and Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4903-4908.
- Venkataraman R and Kellum JA (2007a) Defining acute renal failure: the RIFLE criteria. *J Intensive Care Med* **22**:187-193.



- Venkataraman R and Kellum JA (2007b) Prevention of acute renal failure. *Chest* **131**:300-308.
- Villardaga JP, Steinmeyer R, Harms GS and Lohse MJ (2005) Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* **1**:25-28.
- von Euler US (1935) Über die spezifische blutdrucksenkende substanz des menschlichen prostata- und samenblasensekrets. *Wien Klin Wochenschr* **14**:1182-1183.
- Vukicevic S, Simic P, Borovecki F, Grgurevic L, Rogic D, Orlic I, Grasser WA, Thompson DD and Paralkar VM (2006) Role of EP2 and EP4 receptor-selective agonists of prostaglandin E(2) in acute and chronic kidney failure. *Kidney Int* **70**:1099-1106.
- Walsh DA, Perkins JP and Krebs EG (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**:3763-3765.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG and Schertler GF (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**:486-491.
- Watson C, Jenkinson S, Kazmierski W and Kenakin T (2005) The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. *Mol Pharmacol* **67**:1268-1282.
- Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW and Kenakin TP (1996) The cubic ternary complex receptor-occupancy model. I. Model description. *J Theor Biol* **178**:151-167.
- Willins DL, Berry SA, Alsayegh L, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Friedman L and Roth BL (1999) Clozapine and other 5-hydroxytryptamine-2A receptor antagonists alter the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in vitro and in vivo. *Neuroscience* **91**:599-606.
- Wilson RJ and Giles H (2005) Piglet saphenous vein contains multiple relaxatory prostanoid receptors: evidence for EP4, EP2, DP and IP receptor subtypes. *Br J Pharmacol* **144**:405-415.

- Wilson RJ, Rhodes SA, Wood RL, Shield VJ, Noel LS, Gray DW and Giles H (2004) Functional pharmacology of human prostanoid EP2 and EP4 receptors. *Eur J Pharmacol* **501**:49-58.
- Witherow DS, Garrison TR, Miller WE and Lefkowitz RJ (2004) beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8603-8607.
- Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y and Narumiya S (2009) Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* **15**:633-640.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N and Nugent K (2007) Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* **334**:115-124.
- Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M and Ishikawa Y (2008) Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem* **283**:28702-28709.
- Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T and Narumiya S (2002) Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4580-4585.
- Young RN, Billot X, Han Y, Slipetz DA, Chauret N, Belley M, Metters K, Mathieu M-C, Greig GM, Denis D and Girard M (2004) Discovery and synthesis of a potent, selective and orally bioavailable EP4 receptor agonist. *Heterocycles* **64**:437-446.
- Zheng Y, Ritzenthaler JD, Sun X, Roman J and Han S (2009) Prostaglandin E2 stimulates human lung carcinoma cell growth through induction of integrin-linked kinase: the involvement of EP4 and Sp1. *Cancer Res* **69**:896-904.